

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEVERSON ANTONIO FERREIRA MARTINS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ESPÉCIES DE “MALVAS” E ANÁLISE
MULTIVARIADA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRAS
COMERCIAIS**



**CURITIBA
2015**

CLEVERSON ANTONIO FERREIRA MARTINS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ESPÉCIES DE “MALVAS” E ANÁLISE
MULTIVARIADA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRAS
COMERCIAIS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, linha de pesquisa Produção e Qualidade, do setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^o. Dr^o. Roberto Pontarolo

**CURITIBA
2015**

Martins, Cleverson Antonio Ferreira

Atividade anti-inflamatória de espécies de "malvas" e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais / Cleverson Antonio Ferreira Martins – Curitiba, 2015.
218 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Malva sylvestris*. 2. *Sida cordifolia*. 3. *Pelargonium graveolens*. 4. Atividade anti-inflamatória.
5. Quimiometria. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

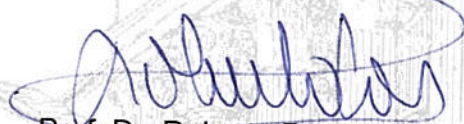
CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO


CLEVERSON ANTONIO FERREIRA MARTINS

Título: “ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ESPÉCIES DE “MALVAS” E ANÁLISE MULTIVARIADA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRAS COMERCIAIS”

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.




Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador




Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Universidade Federal de Santa Catarina



Profª. Drª. Erika Amano
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Poliana Macedo dos Santos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 02 de outubro de 2015.

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto.”
Violeta Parra

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVO GERAL	25
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2 REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1 INFLAMAÇÃO	26
2.1.1. Mediadores químicos da inflamação	27
2.1.1.1 Prostaglandinas	28
2.1.1.2 Tromboxanos	30
2.1.1.3 Leucotrienos	31
2.1.2 Macrófagos e a resposta inflamatória	32
2.1.3 Plantas medicinais com atividade anti-inflamatória	34
2.1.3.1 <i>Malva sylvestris</i>	34
2.1.3.2 <i>Sida cordifolia</i>	35
2.1.3.3 <i>Pelargonium graveolens</i>	38
2.1.4 Métodos analíticos para análise de mediadores inflamatórios	39
2.2 QUIMIOMETRIA	40
2.2.1 Pré-tratamentos de dados	44
2.2.2 Métodos de classificação: PLS-DA	45
2.2.3 O uso da quimiometria no controle de qualidade de plantas	46
2.2.4 Análises de perfil metabólico	49
2.2.4.1 Análises metabólicas de plantas por espectroscopia no IV	50
2.2.4.2 Análises metabólicas de plantas por infusão direta em espectrômetro de massas (DIMS)	51
2.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS EM PRODUTOS NATURAIS	54
2.3.1 Planejamentos experimentais do tipo Centróide Simplex e modelos de superfícies de resposta obtidos com misturas	55
2.3.2 A monografia da <i>M. sylvestris</i> na farmacopéia brasileira	58
2.3.3 Malvidinas	59
 CAPÍTULO 1	
3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS “MALVAS”	63

3.2 MATERIAL E MÉTODOS	66
3.2.1 Obtenção do material vegetal	66
3.2.2 Obtenção de extratos brutos e fracionados	66
3.2.3 Preparo das soluções de extrato	67
3.2.4 Método de extração de eicosanóides do meio de cultivo celular	67
3.2.5 Desenvolvimento de método de análise de eicosanóides por CLAE-EM/EM	68
3.2.5.1 Instrumentação	68
3.2.5.2 Preparo de padrões de PGE ₂ , PGD ₂ , 6-ceto-PGF _{1α} , PGF _{2α} , TXB ₂ , LTB ₄ e PGB ₂ -d ₄	69
3.2.5.3 Infusão direta no espectrômetro de massas	69
3.2.5.4 Otimização automática do equipamento por <i>MRM</i>	70
3.2.5.5 Análise por Injeção em Fluxo (<i>FIA</i>)	70
3.2.5.6 Análise por CLAE-EM/EM	70
3.2.6 Validação do método	71
3.2.6.1 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	72
3.2.6.2 Linearidade	72
3.2.6.3 Seletividade	73
3.2.6.4 Amostras de controle de qualidade	74
3.2.6.5 Efeito residual	74
3.2.6.6 Precisão e exatidão	75
3.2.6.7 Efeito matriz	75
3.2.6.8 Teste de estabilidade em matriz	76
3.2.6.8.1 Estabilidade de curta duração	76
3.2.6.8.2 Estabilidade de pós-processamento	76
3.2.6.8.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	77
3.2.6.8.4 Estabilidade de longa duração	77
3.2.6.9 Teste de estabilidade em solução	78
3.2.6.9.1 Estabilidade da solução de trabalho em bancada	78
3.2.7 Células da linhagem RAW 264.7	78
3.2.7.1 Avaliação da viabilidade e proliferação celular	79
3.2.8 Avaliação do efeito de extratos de <i>M. sylvestris</i> (folhas e flores), <i>S. cordifolia</i> e <i>P. graveolens</i> sobre a liberação de eicosanóides por células RAW 264.7	80

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.3.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE-EM/EM para quantificação de eicosanóides	82
3.3.2 Validação do método analítico	87
3.3.2.1 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	87
3.3.2.2 Linearidade.....	88
3.3.2.3 Seletividade	91
3.3.2.4 Efeito residual.....	92
3.3.2.5 Precisão e exatidão	94
3.3.2.6 Efeito matriz	95
3.3.2.7 Estabilidade	96
3.3.3 Células da linhagem RAW 264.7	98
3.3.3.1 Avaliação da proliferação e viabilidade celular	98
3.3.3.2 Tratamento das células com LPS e dexametasona	107
3.3.4 Avaliação do efeito dos tratamentos com extratos de “malvas”, LPS e dexametasona sobre a liberação de eicosanóides por células RAW 264.7.....	108
3.3.4.1 Extratos de <i>M. sylvestris</i>	111
3.3.4.2 Extratos de <i>S. cordifolia</i>	118
3.3.4.3 Extratos de <i>P. graveolens</i>	122
3.3.5 Atividade anti-inflamatória das “malvas” e a importância dos mediadores prostanóides	127
3.4 CONCLUSÃO.....	132

CAPÍTULO 2

4.1 O USO DA QUIMIOMETRIA PARA CLASSIFICAÇÃO DAS “MALVAS”	135
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	137
4.2.1 Coleta de material vegetal e obtenção de amostras comerciais	137
4.2.2 Preparo das amostras comerciais para análise por infravermelho e obtenção de espectros.....	137
4.2.3 Preparo das amostras comerciais para análise por espectrometria de massas e obtenção de espectros	138
4.2.4 Análises morfo-anatômicas	139
4.2.5 Análises quimiométricas: análise exploratória por PCA e modelos de	

classificação por PLS-DA.....	140
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	141
4.3.1 Obtenção de espectros de FT-MIR por ATR	141
4.3.1.1 Discriminação e classificação de amostras comerciais de “malvas”	145
4.3.1.2 Uma amostra mal classificada.....	150
4.3.2 Obtenção de espectros de massas	152
4.3.2.1 Discriminação e classificação de amostras comerciais de “malvas”	155
4.3.3 Análises morfo-anatômicas	160
4.3.4 Classificação de amostras comerciais.....	162
4.4 CONCLUSÃO.....	165
CAPÍTULO 3	
5.1 O USO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA QUANTIFICAÇÕES EM EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>M. sylvestris</i>	167
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	169
5.2.1 Material vegetal e obtenção de extratos	169
5.2.2 Avaliação de polifenóis (fenólicos totais)	171
5.2.3 Avaliação de atividade antioxidante	171
5.2.3.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio	171
5.2.3.2 Ensaio da redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	172
5.2.4 Obtenção de modelos de superfícies de resposta dos resultados da avaliação de teor de polifenóis e atividade antioxidante	173
5.2.5 Desenvolvimento de método por CLAE/EM-EM para detecção de malvidinas	174
5.2.5.1 Instrumentação.....	174
5.2.5.2 Preparo de amostras e de padrões de malvidinas	174
5.2.5.3 Condições cromatográficas e espectrométricas do método de detecção de malvidinas	175
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	177
5.3.1 Modelos de superfícies de respostas baseados nos resultados de quantificação de polifenóis e atividade antioxidante	177
5.3.2 Método por CLAE-EM/EM para determinação de malvidinas em extratos de folhas e flores de <i>M. sylvestris</i>	186
5.4 CONCLUSÃO.....	195

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	196
REFERÊNCIAS	198
ANEXOS	212

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESPÉCIES DE PLANTAS CUJO NOME POPULAR NO BRASIL ENVOLVE A PALAVRA “MALVA”	23
TABELA 2 – RENDIMENTO EM % (p/p) OBTIDO NO FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CADA ESPÉCIE.....	67
TABELA 3 – PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE PGE ₂ E PGB ₂ -d4.....	83
TABELA 4 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE EICOSANÓIDES.....	85
TABELA 5 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO, EM FUNÇÃO DOS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS, OBTIDOS PARA PGE ₂ , PGD ₂ , PGF _{2α} , 6-ceto-PGF _{2α} E TXB ₂	89
TABELA 6 – VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO E DE ERRO RELATIVO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO	95
TABELA 7 – FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO E VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE CADA ANALITO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ	96
TABELA 8 – ESTABILIDADE DA PGE ₂ , PGD ₂ , PGF _{2α} , 6-ceto-PGF _{1α} , TXB ₂ E PGB ₂ -d4 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	97
TABELA 9 – VARIAÇÕES PERCENTUAIS NAS CONCENTRAÇÕES DE PGE ₂ , PGD ₂ TXB ₂ E PGF _{2α} NAS AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATOS DE <i>M. sylvestris</i> , EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS TRATADAS COM LPS	115
TABELA 10 – VARIAÇÕES PERCENTUAIS NAS CONCENTRAÇÕES DE PGE ₂ , PGD ₂ TXB ₂ E PGF _{2α} NAS AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATOS DE <i>S. cordifolia</i> , EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS TRATADAS COM LPS	121
TABELA 11 – VARIAÇÕES PERCENTUAIS NAS CONCENTRAÇÕES DE PGE ₂ , PGD ₂ TXB ₂ E PGF _{2α} NAS AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATOS DE <i>P. graveolens</i> , EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS TRATADAS COM LPS	126
TABELA 12 – PRINCIPAIS PICOS ENCONTRADOS NO INTERVALO ENTRE 1826-1103 cm ⁻¹ DE TRÊS ESPÉCIES DE “MALVAS” ENCONTRADAS NO BRASIL	144
TABELA 13 – RESULTADOS DE RMSEC, RMSECV E RMSEP PARA O MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS FT-MIR COM NÚMERO DE ONDA ENTRE 1826 A 1103 cm ⁻¹ E PRÉ-PROCESSAMENTOS MSC E CENTRADO NA MÉDIA.....	147
TABELA 14 – RESULTADOS OBTIDOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS DE FT-MIR	150
TABELA 15 – RESULTADOS DE RMSEC, RMSECV E RMSEP PARA O MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS ESI-MS COM PRÉ-PROCESSAMENTO CENTRADO NA MÉDIA.....	157

TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS DE MASSAS.....	160
TABELA 17 – ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E MORFOLÓGICAS DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”	163
TABELA 18 – COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES UTILIZADOS PARA A ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO CENTRÓIDE SIMPLEX	169
TABELA 19 – PROPORÇÕES DE SOLVENTES UTILIZADOS DURANTE O PLANEJAMENTO DE EXTRAÇÕES.....	173
TABELA 20 – PROPORÇÕES DE SOLVENTES, RENDIMENTOS EM MASSA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE FOSFOMOLIBDÊNIO E DPPH E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>M. sylvestris</i>	178
TABELA 21 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO EM MASSA (%)	179
TABELA 22 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH.....	180
TABELA 23 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE PELO MÉTODO DO FOSFOLIBDÊNIO	180
TABELA 24 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	181
TABELA 25 – COEFICIENTES E ERROS PADRÃO DE CADA FATOR NA DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE PREDIÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	182
TABELA 26 – PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE MALVIDINA AGLICONA, MALVIDINA 3-GLUCOSÍDEO E MALVIDINA 3,5-DIGLUCOSÍDEO.....	187
TABELA 27 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE MALVIDINAS	188

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	27
FIGURA 2 – PARTES AÉREAS DA <i>M. sylvestris</i>	34
FIGURA 3 – ESQUEMA GERAL DE OBTENÇÃO DE <i>FINGERPRINTINGS</i> METABÓLICOS	49
FIGURA 4 – UMA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA TODAS AS POSSÍVEIS MISTURAS DE TRÊS COMPONENTES	55
FIGURA 5 – PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS DO TIPO CENTRÓIDE SIMPLEX PARA TRÊS E QUATRO COMPONENTES	57
FIGURA 6 – TRANSFORMAÇÕES ESTRUTURAIS DAS ANTOCIANINAS EM DIFERENTES pH	59
FIGURA 7 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE MALVIDINAS ENCONTRADAS EM PARTES AÉREAS DE <i>M. sylvestris</i>	61
FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DOS ÍONS MOLECULARES DOS PADRÕES DE PGE ₂ , PGD ₂ , PGF _{2α} , 6-ceto-PGF _{1α} , TXB ₂ , LTB ₄ E PGB ₂ -d ₄ , UTILIZANDO IONIZAÇÃO NO MODO NEGATIVO	82
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DA PGE ₂ (Tr: 1,62 min), PGD ₂ (Tr: 1,89 min), PGF _{2α} (Tr: 1,49 min), 6-ceto-PGF _{1α} (Tr: 1,02 min), TXB ₂ (Tr: 1,43 min), LTB ₄ (Tr: 2,82 min) E DA PGB ₂ -d ₄ (Tr: 2,59 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO ENTRE ÁGUA E ACETONITRILA, AMBOS CONTENDO 0,1% DE AFO.	86
FIGURA 10 – CURVAS ANALÍTICAS COM AS RESPECTIVAS EQUAÇÕES DA RETA E VALORES DE COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS POR REGRESSÃO LINEAR 1/x DA PGE ₂ (a), PGD ₂ (b), PGF _{2α} (c), 6-CETO-PGF _{1α} (d) E TXB ₂ (e)	90
FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO E DE AMOSTRAS FORTIFICADAS NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ PARA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE	92
FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO E DE AMOSTRAS FORTIFICADAS NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ E LSQ PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL PARA PGE ₂ , PGD ₂ , PGF _{2α} e 6-ceto-PGF _{1α}	93
FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO E DE AMOSTRAS FORTIFICADAS NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ E LSQ PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL PARA TXB ₂ e PGB ₂ -d ₄	94
FIGURA 14 – IMAGENS DE CÉLULAS RAW 264.7 SOB AUMENTO DE 200x (A) E 400x (B)	98
FIGURA 15 – EFEITO DO LPS (0,5 µg/mL), DA ASSOCIAÇÃO ENTRE LPS E DEXAMETASONA E DA DEXAMETASONA (10 µmol) SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7	99
FIGURA 16 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE <i>M. sylvestris</i> ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7	100

FIGURA 17 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE <i>S. cordifolia</i> ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7	102
FIGURA 18 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE <i>P. graveolens</i> ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7	104
FIGURA 19 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LPS A 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL E 1,5 µg/mL SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7	108
FIGURA 20 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DO EXTRATO BRUTO DE <i>M. sylvestris</i> A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7	111
FIGURA 21 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	112
FIGURA 22 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	112
FIGURA 23 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	113
FIGURA 24 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO REMANESCENTE DO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	113
FIGURA 25 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DO EXTRATO DE FLORES DE <i>M. sylvestris</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7	114
FIGURA 26 – RÓTULOS DE PRODUTOS DESTINADOS AO PREPARO DE INFUSOS, CONTENDO PARTES AÉREAS DE <i>M. sylvestris</i>	116
FIGURA 27 – (A) PRODUTO DE ORIGEM ITALIANA, CONTENDO MISTURA DE FOLHAS E FLORES DE <i>M. sylvestris</i> DESTINADO AO PREPARO DE INFUSOS; (B) FOLHAS DE <i>M. sylvestris</i> OBTIDAS NO BRASIL, DESTINADO AO PREPARO DE INFUSOS.....	117
FIGURA 28 – INFUSOS PREPARADOS COM PARTES AÉREAS DE <i>M. sylvestris</i>	117
FIGURA 29 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS	

E DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. cordifolia</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7	118
FIGURA 30 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE <i>S. cordifolia</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7	119
FIGURA 31 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE <i>S. cordifolia</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	119
FIGURA 32 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE <i>S. cordifolia</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	120
FIGURA 33 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO REMANESCENTE DO EXTRATO DE <i>S. cordifolia</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	120
FIGURA 34 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DO EXTRATO BRUTO DE <i>P. graveolens</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7	123
FIGURA 35 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE <i>P. graveolens</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	123
FIGURA 36 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE <i>P. graveolens</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	124
FIGURA 37 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE <i>P. graveolens</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	124
FIGURA 38 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO REMANESCENTE DO EXTRATO DE <i>P. graveolens</i> A 10 µg/mL E 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ E PGF _{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.....	125
FIGURA 39 – ESPECTRO FT-MIR DAS FOLHAS DE <i>M. sylvestris</i> , OBTIDO PELO	

MÉTODO ATR.....	141
FIGURA 40 – ESPECTRO FT-MIR DAS FOLHAS DE <i>S. cordifolia</i> , OBTIDO PELO MÉTODO ATR.....	142
FIGURA 41 – ESPECTRO FT-MIR DAS FOLHAS DE <i>P. graveolens</i> , OBTIDO PELO MÉTODO ATR.....	142
FIGURA 42 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS FT-MIR CARACTERÍSTICOS DE <i>M. sylvestris</i> (a), <i>S. cordifolia</i> (b) E <i>P. graveolens</i> (c), OBTIDOS PELO MÉTODO ATR.....	143
FIGURA 43 – (a) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”; (b) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”.....	147
FIGURA 44 – AVALIAÇÃO DA PREDITABILIDADE DO MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS FT-MIR NA CLASSIFICAÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES DE “MALVAS”	149
FIGURA 45 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE UMA AMOSTRA MAL CLASSIFICADA PELO MÉTODO PLS-DA	151
FIGURA 46 – PERFIL METABÓLICO OBTIDO INJEÇÃO DIRETA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE “MALVAS” EM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS NO MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO	153
FIGURA 47 – (a) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”; (b) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”.....	156
FIGURA 48 – AVALIAÇÃO DA PREDITABILIDADE DO MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS ESI-MS NA CLASSIFICAÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES DE “MALVAS”	159
FIGURA 49 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE SEÇÕES TRANSVERSAIS E POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE AMOSTRAS DE “MALVAS”	162
FIGURA 50 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO CENTRÓIDE SIMPLEX UTILIZADO PARA OTIMIZAR AS EXTRAÇÕES.....	171
FIGURA 51 – DIAGRAMA DE PARETO RELACIONANDO OS EFEITOS DE CADA VARIÁVEL PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL DE PREDIÇÃO DE TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	183
FIGURA 52 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CÚBICO ESPECIAL PARA PREDIÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>M. sylvestris</i> (mg/g) EM FUNÇÃO DAS PROPORÇÕES DE ÁGUA, METANOL E ETANOL.....	184
FIGURA 53 – APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO DE DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	

PELO MODELO CUBICO ESPECIAL PARA AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>M. sylvestris</i>	185
FIGURA 54 – AVALIAÇÃO DOS ÍONS MOLECULARES DOS PADRÕES DE MALVIDINA AGLICONA, MALVIDINA 3-GLUCOSÍDEO E MALVIDINA 3,5-DIGLUCOSÍDEO, UTILIZANDO IONIZAÇÃO NO MODO POSITIVO.....	186
FIGURA 55 – CROMATOGRAMA RELATIVO A MISTURA DE PADRÕES DE MALVIDINA AGLICONA, MALVIDINA 3-GLUCOSÍDEO E MALVIDINA 3,5-DIGLUCOSÍDEO.....	189
FIGURA 56 – CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>M. sylvestris</i> UTILIZANDO COMO SOLVENTE EXTRATOR DIFERENTES PROPORÇÕES DOS SOLVENTES ÁGUA, METANOL, ETANOL E ACETONA.....	190
FIGURA 57 – (a) CROMATOGRAMA RELATIVO A MISTURA DE PADRÕES DE MALVIDINAS; (b) CROMATOGRAMA RELATIVO A EXTRATO METANÓLICO DE FLORES DE <i>M. sylvestris</i>	193

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	- Porcentual
6-ceto-PGF _{1α}	- 6 ceto-prostaglandina-F1 alfa
AAR%	- Atividade antioxidante relativa
ACN	- Acetonitrila
AcOEt	- Acetato de Etila
AFO	- Ácido Fórmico
AINES	- Anti-inflamatório não-esteroidal
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- Ionização Química à Pressão Atmosférica
ATR	- Reflectância total atenuada
C5a	- Fragmento do sistema complemento que atua como agente quimiotático para neutrófilos
CAD	- Gás de colisão
CE	- Energia de colisão
CEP	- Potencial de Entrada da célula de colisão
CG	- Cromatografia Gasosa
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	- Cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CLAE-EM/EM	- CLAE acoplado à espectrometria de massas <i>Tandem</i>
CO ₂	- Gás Carbônico
COX	- Ciclooxygenase
CP	- Componente Principal
cPLA ₂	- Fosfolipase A2 citosólica
Cps	- Contagens por segundo
CUR	- Gás de Cortina
CV%	- Coeficiente de Variação
CXP	- Potencial da célula de saída
Cyp	- Citocromo-oxidase
d.C	- Depois de Cristo
Da	- Dalton
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DIMS	- Infusão direta em espectrômetro de massas
DP	- Potencial de desagregação
DP	- Desvio padrão
DP	- Potencial de desagregação
DPPH	- 1,1-Difenil-2-picrihidrazil
DPR	- Desvio Padrão Relativo
DRIFTS	- Reflectância difusa por transformada de Fourier

DUPLEX	- Algoritmo de divisão de dados
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
EFS	- Extração em Fase Sólida
EGRF-MAPK	- Fator de crescimento epidermal-quinase ativada por mitógeno
ELAM	- Molécula de adesão entotelial para leucócitos
EM	- Espectrometria de massas
EP	- Potencial de entrada
EP	- Potencial de entrada
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
ESI	- <i>Eletrospray</i>
ESI-MS	- Ionização por eletrospray em espectrometria de massas
FAP	- Fator de agregação plaquetária
Fc	- Parte da molécula do anticorpo que se liga ao antígeno
FIA	- Análise por Injeção em Fluxo
FT-IR	- Infravermelho com transformada de Fourier
FT-MIR	- Infravermelho médio com transformada de Fourier
FT-NIR	- Infravermelho próximo com transformada de Fourier
g	- grama
GS1	- Gás de nebulização
GS2	- Gás Secante
HCA	- Análise Hierárquica de Agrupamentos
IC ₅₀	- Concentração inibitória de 50%
ICAM-1	- molécula de adesão intercelular 1
IFN-γ	- Interferon-gama
IL	- Interleucina
iPLS	- Intervalo por mínimos quadrados parciais
IS	- Voltagem do capilar
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	- Infravermelho
Kg	- Quilograma
KNN	- Vizinho mais próximo
LOX	- Lipooxigenase
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTB ₄	- Leucotrieno-B ₄
LV	- Variável latente
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
MeOH	- Metanol
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MPO	- Mieloperoxidase
MRM	- Monitoramento de Reações Múltiplas
MSC	- Correção multiplicativa de espalhamentos
NAG	- N-acetil-glicosaminidase
NIPALS	- Iterativa não-linear de mínimos quadrados parciais

NO	- Óxido Nítrico
°C	- Graus Celsius
p/v	- peso/volume
p:p	- peso:peso
p:v	- peso:volume
PBS	- Tampão fosfato-salino
PCA	- Análise das Componentes Principais
PEG	- Polietilenoglicol
PGB ₂ -d4	- Prostaglandina-B2 deuterada
PGD ₂	- Prostaglandina-D2
PGE ₂	- Prostaglandina-E2
PGF _{2α}	- Prostaglandina-F2 alfa
pH	- Potencial hidrogeniônico
PLA2	- Fosfolipase A2
PLS	- Mínimos quadrados parciais
PLS-DA	- Mínimos quadrados parciais para análise discriminante
<i>R</i>	- Coeficiente de correlação linear
<i>R</i> ²	- Coeficiente de determinação
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RE	- Resolução Específica
Rf	- Fator de retenção
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMSEC	- Raiz quadrada do erro médio de calibração
RMSECV	- Raiz quadrada do erro médio de validação cruzada
RMSEP	- Raiz quadrada do erro médio de predição
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
rpm	- Rotações por minuto
SFB	- Soro Fetal Bovino
SIMCA	- Modelagem de classes por componentes principais
SUS	- Sistema Único de Saúde
TBME	- Terc-Butil-Metil-Éter
TNF	- Fator de necrose tumoral
TPA	- Tetradecanoil forbol acetato
TXB ₂	- Tromboxano-B2
UV	- Ultravioleta
V	- Volts
VCAM-1	- Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VIP	- Análise da importância da projeção de variáveis
Σ	- Somatório

RESUMO

Diversas plantas medicinais são conhecidas como “Malvas” no Brasil, e entre as mais importantes estão a *Malva sylvestris* (conhecida como “malva”), a *Sida cordifolia* (conhecida como “malva-branca”) e o *Pelargonium graveolens* (conhecido como “malva-cheirosa”). Segundo o conhecimento etnobotânico e o uso tradicional popular, estas três espécies apresentam, entre outras, atividades anti-inflamatórias. Apesar do uso disseminado, pouca informação se tem a respeito dos mecanismos de ação que elas utilizam. Além disso, estas plantas muitas vezes apresentam problemas de má classificação e rotulagens inadequadas, o que pode levar a problemas de saúde caso o paciente consuma uma espécie não indicada. De todas as espécies de “malvas”, a única a possuir uma monografia na Farmacopéia Brasileira e cujo consumo é recomendado pelo SUS é a *M. sylvestris*. Este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de extratos das três espécies sobre a liberação de mediadores inflamatórios por células RAW 264.7 e utilizar técnicas multivariadas para auxiliar no controle de qualidade de produtos comerciais. Para a quantificação dos mediadores PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} e TXB₂, um método por CLAE-EM/EM foi desenvolvido e validado. O método analítico utilizou uma coluna cromatográfica muito comum em laboratórios (C-18, 4,6x50 mm, 1,8 μm), fornecendo um tempo de análise de 4 minutos. A validação mostrou excelentes linearidade, exatidão, precisão, efeitos matriz e residual e estabilidade, estando todos os parâmetros dentro dos limites aceitáveis de acordo com a RDC ANVISA N. 27/2010. Considerando os extratos brutos, as taxas de redução dos mediadores inflamatórios causados pelos extratos das plantas variaram de 29% a 47%, sendo o extrato de *S. cordifolia* o que causou maior redução, seguido do extrato de flores de *M. sylvestris*, folhas de *M. sylvestris*, e folhas de *P. graveolens*. Utilizando os dados espectrais obtidos por técnica de infravermelho e de massas diretamente das folhas ou de extratos de folhas, as técnicas quimiométricas PCA e PLS-DA possibilitaram a análise exploratória e de classificação, respectivamente, de um conjunto de 60 amostras comerciais. Esta classificação foi validada e confirmada através de análises morfo-anatômicas de todas as amostras, comparando-as com padrões de referência de cada espécie. Planejamentos experimentais do tipo Centróide Simplex indicaram que a melhor combinação de solventes para extração de polifenóis de folhas de *M. sylvestris* foi aquela que utilizou 70% de etanol e 30% de água. Com os resultados obtidos deste planejamento, foi elaborado um modelo de superfície de resposta estatisticamente significativo e que pode ser aplicado na previsão do teor de polifenóis de acordo com a mistura de solventes utilizada na extração.

Palavras-chave: *Malva sylvestris*, *Sida cordifolia*, *Pelargonium graveolens*, atividade anti-inflamatória, quimiometria

ABSTRACT

Several medicinal plants are known as "Malvas" in Brazil, and among those, the most important are *Malva sylvestris* (known as "malva"), *Sida cordifolia* (known as "malva-branca") and *Pelargonium graveolens* (known as "malva-cheirosa"). According to ethnobotanical traditional folk knowledge, these three species have anti-inflammatory activity. Despite their widespread uses, there is limited information on their mechanisms of action. Moreover, these plants often show classification problems and inadequate labeling, which may lead to health problems if the patient consumes a non indicated species. Among all the species of "malva", the only one having a monograph in the Brazilian Pharmacopoeia and whose consumption is recommended by the SUS is the *M. sylvestris*. This study aimed to evaluate the effect of the three species on the release of inflammatory mediators by RAW 264.7 cells and use multivariate techniques to assist in quality control of commercial products. For the quantification of mediators PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} and TXB₂, a method by HPLC-MS/MS was developed and validated. The analytical method used a common chromatography column (C-18 4.6x50 mm, 1.8 μm), providing an analysis within 4 minutes. The validation showed excellent linearity, accuracy, precision, matrix and residual effects and stability, with all parameters presenting values in accordance to the limits imposed by ANVISA RDC N°. 27/2010. Considering the crude extracts, reduced rates of inflammatory mediators caused by the plant extracts ranged from 29% to 47%. The extract of *S. cordifolia* caused greater reduction, followed by the extract of *M. sylvestris* flowers, *M. sylvestris* leaves and *P. graveolens* leaves. Using the spectral data obtained by infrared and mass spectrometry techniques, which were obtained directly from the leaves or leaf extracts, the chemometric techniques (PLS-DA) allowed the classification and grouping of a set of 60 commercial samples according to species to which they belonged. This classification was validated and confirmed by morphological and anatomical analyzes of all samples, comparing them with reference patterns of each species. The Simplex Centroid design for experiments with mixtures indicated that the best combination of solvents for extraction of polyphenols from *M. sylvestris* leaves was the one using 70% ethanol and 30% water. With the present results it was designed a statistically significant response surface model that can be applied in predicting the content of polyphenols in accordance with the mixture of solvents used in the extraction.

Key-words: *Malva sylvestris*, *Sida cordifolia*, *Pelargonium graveolens*, antiinflammatory activity, chemometrics

1 INTRODUÇÃO

Remédios à base de plantas têm sido utilizados por diversos grupos étnicos desde tempos remotos para o tratamento de uma infinidade de doenças. Dentre as propriedades que as plantas podem apresentar, destaca-se a anti-inflamatória, atuando como antipirética, analgésica e cicatrizante (COLVARD *et al.*, 2006). No Brasil, em função do grande espaço territorial, biodiversidade de espécies e condição econômica da maioria da população, as plantas medicinais são amplamente utilizadas como recurso terapêutico no tratamento de diversos tipos de inflamações.

Muitas vezes o controle de qualidade das plantas medicinais torna-se difícil em função da forma com que elas são apresentadas ao paciente ou consumidor final. Tanto na forma a granel quanto industrializada, estes produtos são dispensados para uso através de preparações caseiras como macerados, infusos e decocções, e administrados geralmente na forma de chás. Dessa forma, as partes da planta utilizadas no produto estão rasuradas ou na forma de pó, o que dificulta o controle de qualidade farmacognóstico tradicional, através de aspectos morfoanatômicos. Assim, a dificuldade quanto à correta identificação do material vegetal leva a incertezas tanto pelo profissional de saúde no momento da dispensação quanto pelo paciente no momento da administração da planta medicinal. Tendo em vista a diversidade de plantas existentes no mercado e o baixo rigor adotado durante o controle de qualidade, o consumo indiscriminado deste tipo de remédio pode estar atrelado a um grande número de reações adversas. Isto porque diversas plantas apresentam efeitos tóxicos mesmo quando consumidas em baixas doses e, além disso, os efeitos terapêuticos desejados pelo paciente podem não ser atingidos em função da administração de uma espécie que não é a indicada para o seu problema.

No Brasil, a nomenclatura regional ou popular dado às plantas medicinais também é uma fonte de equívoco tanto na dispensação quanto na administração. Diferenças culturais e/ou semelhanças de pronúncia fazem com que plantas de diferentes espécies sejam conhecidas por nomes similares. Dentre as plantas em que isso ocorre, destacam-se aquelas que são conhecidas como “Malvas”, muito comuns em todas as regiões do Brasil. A

Tabela 1 relaciona 21 espécies de plantas medicinais cujo nome popular ou regional envolve a palavra “malva”. Interessantemente, nem todas estas espécies pertencem à família das malváceas, o que mostra que a forma com que a planta é conhecida nem sempre segue critérios científicos.

TABELA 1 – ESPÉCIES DE PLANTAS CUJO NOME POPULAR NO BRASIL ENVOLVE A PALAVRA “MALVA”

ESPÉCIE	FAMÍLIA	NOME POPULAR
<i>Alcea rosea</i> L.	Malvaceae	Malva-da-índia; malva-rosa; malva-real; malva-isabela; malva-loca
<i>Althaea officinalis</i> L.	Malvaceae	Malva-branca; malva-do-pântano
<i>Coleus amboinicus</i> (Lour.) Andr.	Lamiaceae	Malva
<i>Hibiscus bifurcatus</i> Cav.	Malvaceae	Malva-vinagreira
<i>Malva</i> sp	Malvaceae	Malva-de-cheiro
<i>Malva crispa</i> L.	Malvaceae	Malva, malva-crespa
<i>Malva moschata</i> L.	Malvaceae	Malva-almiscarada
<i>Malva parviflora</i> L.	Malvaceae	Malva-rasteira; malva-de-flor-pequena; malva-de-botica; malva-de-cheiro
<i>Malva sylvestris</i> L.	Malvaceae	Malva; malva-grande; malva-das-boticas; malva-silvestre, malva-de-casa; malva-rosa
<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.	Malvaceae	Malva-de-colibri
<i>Pelargonium</i> sp	Geraniaceae	Malva-de-cheiro-branca; malva-cheirosa; malva-de-cheiro
<i>Pelargonium graveolens</i> L'Her.	Geraniaceae	Malva-cheirosa-roxa
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	Lamiaceae	Malva
<i>Plectranthus barbatus</i> Andrews	Lamiaceae	Malva-amarga; malva-santa
<i>Sida cordifolia</i> L.	Malvaceae	Malva-branca
<i>Sida rhombifolia</i> L.	Malvaceae	Malva-preta; malva
<i>Sidastrum</i> sp	Malvaceae	Malva-da-Bahia
<i>Urena lobata</i> L.	Malvaceae	Malva-de-embira; malva-roxa-recortada; malva-roxa
<i>Waltheria communis</i> A. St.-Hil.	Malvaceae	Malva-branca; malva-veludo
<i>Waltheria douradinha</i> St. Hilaire	Malvaceae	Malva-branca; malva-veludo
<i>Waltheria indica</i> L.	Malvaceae	Malva-branca; malva-veludo

FONTE: O autor, (2013)

Destas plantas conhecidas como “malvas”, destaca-se no sul do Brasil o consumo da *Malva sylvestris* (conhecida como “malva”), da *Sida cordifolia* (conhecida como “malva-branca”) e *Pelargonium graveolens* (conhecida como “malva-cheirosa”). De modo geral, segundo a literatura etnobotânica, todas elas

apresentam atividade anti-inflamatória, em maior ou menor grau, porém atuando especificamente em tecidos diferentes. *M. sylvestris* é principalmente indicada para infecções de boca e garganta (PIERONI *et al.*, 2004; GUARRERA *et al.*, 2005), enquanto *S. cordifolia* atua como um tradicional anti-reumático e antipirético (SAMY *et al.*, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2011) e *P. graveolens* atua principalmente contra inflamações oriundas de enfermidades do estômago (VENDRUSCOLO, MENTZ, 2006; CAVAR, MAKSIMOVI, 2012).

Apesar de amplamente utilizadas e já estabelecidas na medicina popular tradicional, apenas a *M. sylvestris* possui monografia na Farmacopéia Brasileira 4ª edição, mesmo não sendo uma planta nativa do Brasil. O consumo desta planta é, inclusive, incentivado pelo governo brasileiro, já que ela faz parte do rol de plantas medicinais elencadas no Anexo I da RDC ANVISA N° 10, de 9 de março de 2010 (BRASIL, 2010). Esta resolução regulamenta o uso de plantas medicinais de uso tradicional popular no Brasil que são de venda livre e utilizadas exclusivamente na forma de droga vegetal para o preparo de infusões, decoctos e macerações.

Dessa forma, assumindo que boa parte da população desconhece os aspectos morfológicos e anatômicos de plantas medicinais, muitas vezes os pacientes adquirem e consomem outras espécies também conhecidas como “malva” que não a oficialmente recomendada *M. sylvestris*.

Esta tese está dividida em um referencial teórico (que aborda toda a revisão bibliográfica) e em três capítulos. No primeiro, foram avaliados os efeitos anti-inflamatórios de extratos de folhas e flores de *M. sylvestris* e folhas de *S. cordifolia* e *P. graveolens*. Estes extratos (brutos e fracionados) foram adicionados a cultivos de células RAW 264.7 (macrófagos de rato) e, no sobrenadante, foram quantificados os níveis dos mediadores inflamatórios PGE₂, PGD₂, 6-ceto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, LTB₄ e TXB₂. No segundo capítulo, espectros de infravermelho e massas foram obtidos de amostras comerciais de “Malvas” adquiridas de diversas regiões do país, e com o auxílio da quimiometria, foram separados em grupos de cada uma das espécies. Para a validação deste método, foram obtidas imagens das superfícies das folhas (microscopia eletrônica de varredura) e de cortes transversais do mesófilo foliar (microscopia óptica) de todas as amostras, que então foram comparadas com

padrões das três espécies devidamente identificadas e depositadas em museu botânico. No terceiro capítulo, um planejamento experimental do tipo centróide simplex aplicando mistura de 4 solventes (água, metanol, etanol e acetona) foi utilizado para otimizar a extração do marcador farmacopéico nas folhas de *M. sylvestris*, malvidina-3-glucosídeo. Adicionalmente, utilizando o mesmo planejamento experimental, foram quantificados os teores de compostos fenólicos e avaliada a capacidade antioxidante dos extratos, e então superfícies de resposta foram propostas para cada uma das quantificações.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a relação entre derivados eicosanóides e a atividade anti-inflamatória de extratos de espécies de “Malvas” (*M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens*) e utilizar técnicas multivariadas para auxiliar no controle de qualidade de amostras comerciais.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver e validar método analítico por CLAE-EM/EM para quantificação dos eicosanóides PGE₂, PGD₂, 6-ceto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, LTB₄ e TXB₂;
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos brutos e frações das três espécies, utilizando cultivos de células RAW 264.7;
- ✓ Desenvolver modelos por PCA para análise exploratória e por PLS-DA para classificação de amostras comerciais das espécies de *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens*, utilizando os dados espectrais obtidos por espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas;
- ✓ Otimizar a extração de compostos fenólicos e antioxidantes através de planejamento experimental do tipo Centróide Simplex e obter modelos de superfícies de resposta;
- ✓ Desenvolver método cromatográfico por CLAE-EM/EM para quantificação de malvidina, oenina e malvina em folhas e flores de *M. sylvestris*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFLAMAÇÃO

A palavra inflamação tem origem no grego (*phlogosis*) e no latim (*flamma*), ambas significando “fogo”, ou “área em chamas”. Descrições sobre as características clínicas da inflamação já existiam há mais de dois milênios, porém, somente no século I d.C., os quatro sinais cardinais da inflamação (rubor, inchaço, calor e dor) foram descritos por Celsius (ROCK; KONO, 2008). Hoje se sabe que estes quatro sinais primários se relacionam com eventos fisiológicos durante o processo inflamatório, que envolvem dilatação de vasos, aumento de fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade vascular, aumento de temperatura local e quimiotaxia de células e mediadores da inflamação (CUZZOCREA, 2005). Muitos séculos depois, em 1843, Rudolf Virchow instituiu a *perda de função* como o quinto sinal cardinal da inflamação, inclusive relacionando este fato com a origem de alguns tipos de câncer (GREENE *et al.*, 2009).

A inflamação se traduz como uma intensa mobilização dos sistemas de defesas celular e humoral do organismo, com participação vascular, neural e hormonal, desencadeada por estímulos físicos, químicos ou biológicos (VITA RODRIGUEZ; LAWRENCE, 2010). Apesar de ser a primeira linha de defesa do organismo contra lesões teciduais, uma resposta inflamatória excessiva pode tornar-se uma fonte de lesão ainda maior do que a provocada pelo estímulo inicial (GAO *et al.*, 2003). É dividida classicamente entre inflamação aguda e crônica. A primeira refere-se à resposta que começa de maneira abrupta, sendo associada à agressão súbita. Dura de poucos minutos a algumas horas e envolve reação exsudativa na qual fluído, proteínas e leucócitos do tipo neutrófilos saem da circulação e se dirigem para o local da agressão. Se o agente agressor é persistente, a inflamação pode tornar-se crônica, onde ocorre uma reação proliferativa com propagação de fibroblastos, elementos vasculares e células mononucleares (macrófagos e linfócitos, principalmente) (BOGATCHEVA *et al.*, 2005).

O tecido inflamado responde, controla e modula a inflamação através de uma variedade complexa de reações atreladas a mediadores químicos, muitos dos quais ainda não são totalmente conhecidos. Os mediadores químicos farmacologicamente significativos incluem a histamina, Fator de Ativação Plaquetária (FAP), citocinas, bradicinina e os eicosanóides (RANG *et al.*, 2007).

2.1.1 Mediadores químicos da inflamação

A principal fonte de mediadores químicos da inflamação é o ácido araquidônico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), um ácido graxo insaturado de vinte carbonos (“*eicosa*”) contendo quatro duplas ligações (“*tetraenóico*”) (LUO; FLAMAND; BROCK, 2006). A Figura 1 representa a estrutura química do ácido araquidônico.

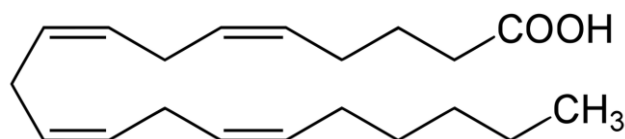


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO
FONTE: Adaptado de BLEWETT *et al.*, (2008)

Os eicosanóides são os metabólitos oxidativos do ácido araquidônico, responsáveis por uma ampla variedade de funções biológicas incluindo a regulação da inflamação (BLEWETT *et al.*, 2008).

O ácido araquidônico encontra-se na membrana das células na forma esterificada, sendo integralmente proveniente dos fosfolípidos. Através da ação das enzimas como a Fosfolipase A2 (PLA₂), os fosfolípidos da membrana são clivados e o ácido araquidônico surge como produto desta reação (LUO; FLAMAND; BROCK, 2006). Diversos tipos de estímulos podem levar a liberação de ácido araquidônico por diferentes tipos de células, entre eles a trombina nas plaquetas, C5a nos neutrófilos, bradicinina nos fibroblastos e reações antígeno-anticorpo nos mastócitos (BOGATCHEVA *et al.*, 2005; RANG *et al.*, 2005).

O ácido araquidônico liberado pode então tornar-se substrato de três caminhos enzimáticos oxidativos diferentes, sendo eles a ciclooxigenase

(COX), a lipooxigenase (LOX) e o citocromo P450 (CYP). A via da COX está relacionada com a síntese de prostanóides que incluem as prostaglandinas (PGs) e os tromboxanos (TXs), enquanto que a LOX está envolvida na síntese de leucotrienos (LTs), lipoxinas (LX) e alguns ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETEs) e o CYP produz principalmente os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), os ácidos dihidroxieicosatrienóicos (DiHETEs) e alguns HETEs (BLEWETT *et al.*, 2008; PÉREZ-CHACÓN *et al.*, 2009).

As ciclooxygenases (COX), também chamadas de PG endoperóxido sintases, possuem duas isoformas identificadas, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 apresenta-se de forma constitutiva nos tecidos corpóreos, envolvendo-se na produção de prostanóides relevantes em processos fisiológicos, enquanto a COX-2 é produzida principalmente em função do estímulo gerado por estados inflamatórios (BURIAN, GEISLINGER, 2005).

Dentre os metabólitos da COX, as prostaglandinas apresentam como característica estrutural um anel de ciclopentano, e os tromboxanos apresentam um anel de seis membros. As substituições nestes anéis conferem as diferenças entre as famílias destas moléculas, as quais são classificadas por letras, e os números subscritos representam sempre o número de duplas ligações existentes (NAKAHATA, 2008). Com relação aos principais metabólitos da LOX, os leucotrienos, estes apresentam como característica estrutural marcante a presença da unidade trieno conjugada.

2.1.1.1 Prostaglandinas

Todas as células, com exceção dos eritrócitos, têm capacidade de produzir prostaglandinas por um fenômeno conhecido como “cascata do ácido araquidônico” (HARRIS *et al.*, 2002). Após a metabolização do ácido araquidônico pela PLA₂, a síntese de prostaglandinas inicia-se com as ciclooxygenases (COX 1 e 2) produzindo endoperóxidos instáveis (PGG₂ e posteriormente PGH₂). Então, sintetases prostaglandina-específicas existentes nas células convertem a PGH₂ em uma série de prostaglandinas biologicamente ativas, dentre as quais se destacam a PGI₂, PGF_{2α}, PGD₂ e PGE₂ (HARRIS *et al.*, 2002; TAKEMIYA; MATSUMURA; YAMAGATA, 2007).

Após a síntese, as prostaglandinas são rapidamente liberadas das células e agem então próximo ao sítio de produção por ligação à receptores específicos e de alta afinidade (HARRIS *et al.*, 2002). As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo contração e relaxamento da musculatura brônquica ou uterina; hipotensão; metabolismo ósseo; aumento do fluxo sanguíneo renal, resultando em diurese, natriurese, caliorese e estimulação da secreção de renina; proteção da mucosa gástrica e regulação do fluxo sanguíneo local; inibição da secreção ácida gástrica; crescimento e desenvolvimento do tecido nervoso; controle do ciclo do sono; resposta endócrina; angiogênese; progressão metastática; ejaculação, ereção e transporte de espermatozoides; parto, menstruação, fertilização e ovulação, dentre outros (MUBARAK, 2010).

Todos os processos inflamatórios favorecem a biossíntese de prostaglandinas que contribuem para a gênese dos sinais e sintomas da inflamação. Assim, algumas prostaglandinas estão envolvidas na vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular (WANG; DuBOIS, 2008), na regulação da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares e na resposta imunológica e hiperalgesia, através da hipersensibilização dos nociceptores polimodais das fibras C a estímulos mecânicos e químicos (CHEN; TANNER; LEVINE, 1999). Classicamente, PGE_2 e PGI_2 são responsáveis pela maior parte dos efeitos relacionados à inflamação, estando envolvidas no desenvolvimento da febre, hiperalgesia, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (BLEWETT *et al.*, 2008).

Cada tipo de prostaglandina atua fisiologicamente em seu receptor específico. A PGD_2 (agindo sobre receptores denominados *DP*) atua causando vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, relaxamento dos músculos gastrointestinal e uterino e também modificando a liberação de hormônios hipotalâmicos/hipofisários. A PGE_2 possui mais de um receptor identificado, atuando sobre o EP_1 na contração do músculo liso brônquico e gastrointestinal, sobre os EP_2 causando bronco e vasodilatação, aumento da secreção gastrointestinal e relaxamento do músculo liso gastrointestinal, e sobre os EP_3 causando contração do músculo liso intestinal, inibição da secreção ácida gástrica, aumento da secreção de muco, inibição da lipólise e da liberação de

neurotransmissores autonômicos e estimulação do útero gravídico. A PGE_2 ainda atua sobre receptores desconhecidos na produção de febre, inibição da proliferação das células T e ativação dos macrófagos, na liberação de esteróides supra-renais e eritropoietina pelo rim, na broncodilatação, vasodilatação e relaxamento do músculo liso intestinal. Com relação ao $\text{PGF}_{2\alpha}$, agindo sobre os receptores FP , atua principalmente na contração do miométrio em humanos. A PGI_2 age sobre os receptores IP , causando vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, liberação de renina e natriurese por efeitos sobre a reabsorção tubular de sódio (RANG *et al.*, 2005; WANG; DuBOIS, 2008; MUBARAK, 2010).

2.1.1.2 Tromboxanos

Os tromboxanos são sintetizados a partir da prostaglandina- H_2 , através da catálise enzimática de tromboxano-sintases. O primeiro produto que surge desta reação é o tromboxano- A_2 (TXA_2), que é rapidamente convertido a tromboxano- B_2 (TXB_2) (NAKAHATA, 2008).

O TXA_2 é um metabólito muito instável, possuindo um tempo de meia-vida de 30 segundos. Apesar da baixa estabilidade, o TXA_2 é o responsável por todas as atividades fisiológicas e patofisiológicas desta categoria de eicosanóides, sendo o seu produto de degradação, o TXB_2 , inativo. O TXA_2 age em função de ligação em seu receptor acoplado à proteína-G (denominado TP) em diversos sítios no organismo, que incluem músculos lisos, plaquetas, células endoteliais, sistema nervoso central e periférico, rins e sistema imune, e também está envolvido em processos de inflamação e alergia (NAKAHATA, 2008).

Atuando nos músculos lisos, o TXA_2 tem alta atividade contrátil, principalmente nos brônquios, intestino, útero e bexiga. Uma das mais importantes ações do TXA_2 é a ativação plaquetária, promovendo a agregação e conseqüente formação de trombos, que é a principal causa de infartos cerebrais e do miocárdio (KATUGAMPOLA; DAVENPORT, 2001). Nas células endoteliais, TXA_2 atua acelerando a expressão de proteínas de adesão intracelulares e vasculares (ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente), e também

moléculas de adesão de leucócitos, como a ELAM-1 (ISHIZUTA *et al.*, 1998). Outras funções nas células endoteliais do TXA₂ incluem a estimulação da migração celular e da produção de PGI₂, a qual atenua a agregação plaquetária e contração dos músculos lisos, servindo como um regulador por *feedback* negativo (NIE *et al.*, 2000). Atuando no sistema nervoso, o TXA₂ realiza a modulação de liberação de hormônios e interleucinas, estimula os neurônios periféricos e está envolvido nos reflexos pulmonar e cardiovascular. (NAKAHATA, 2008). Nos rins, o TXA₂ promove mudanças no fluxo de íons, contração das células mesangiais glomerulares e dos vasos do tecido renal, além de estimular a produção de metabólitos como fator de crescimento, fibronectina, laminina e colágeno (BROWNAB; VENUTO, 1999). No sistema imune, o TXA₂ estimula a divisão de células CD4+ e CD8+, além de atuar na quimiotaxia de células T (NAKAHATA, 2008).

Na inflamação e alergia, o TXA₂ tem um papel importante na medida em que tem sido relatada a sua relação com a patogênese de processos inflamatórios e alérgicos (principalmente das vias aéreas superiores, como no caso da rinite), onde atua como regulador da quimiotaxia de neutrófilos, aumentando a dificuldade de passagem de ar pelas vias aéreas e a permeabilidade vascular nasal (SHIRASAKI *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Leucotrienos

Os leucotrienos (LTs) são os derivados do ácido araquidônico originalmente isolados de leucócitos polimorfonucleares de coelhos, de onde provém o seu nome. São originados em resposta a estímulos inflamatórios e imunes, que conduzem à mobilização do cálcio intracelular, o que inicia a sua cascata de biosíntese (RINALDO-MATTHIS; HAEGGSTRÖM, 2010).

Os leucotrienos são produzidos pela atividade da enzima 5-lipooxigenase, a qual é ativada pela ação do cofator “Proteína Ativadora de 5-lipooxigenase” (FLAP), levando primeiramente à formação de um intermediário instável denominado LTA₄. Este pode ser então enzimaticamente convertido à LTB₄ pela LTA₄-hidrolase ou à LTC₄ pela LTC₄-sintase (YOKOMIZO *et al.*, 1995). O LTC₄ dá então origem a outros leucotrienos como LTD₄, LTE₄ e LTF₄.

(conjunto que, juntamente com o LTC₄, é denominado “cisteinil-leucotrienos”), através da ação de enzimas da família das *peptidases*, cada qual sendo formado dependendo do tipo celular envolvido (REDDANNA *et al.*, 2003). O grupo cisteinil-leucotrienos é assim designado em função de possuir um resíduo do aminoácido ligado no carbono 6 das suas estruturas (HOLGATE; BRADDING; SAMPSON, 1996; RANG *et al.*, 2007).

Os leucotrienos possuem vários efeitos sobre os processos inflamatórios, principalmente na fase aguda. O pulmão é um dos órgãos que mais respondem à fabricação de leucotrienos, razão esta que confere à asma numerosos estudos relacionados ao metabolismo destes derivados do ácido araquidônico (BUCCELLATI *et al.*, 2002; HOUSSEN *et al.*, 2010).

Na inflamação, o LTB₄ atua como um potente agente quimiotático com relação a neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Nos neutrófilos, também é responsável pela regulação das moléculas de aderência à membrana, e nos macrófagos e linfócitos, estimulam a proliferação e a liberação de citocinas (CROOKS; STOCKLEY, 1998).

Os cisteinil-leucotrienos são altamente espasmogênicos, especialmente no trato respiratório e na microcirculação, levando a broncoconstrição e vasoconstrição, respectivamente, além de aumentarem a secreção de muco, implicando na patogênese da asma (RINALDO-MATTHIS; HAEGGSTRÖM, 2010; BLEWETT *et al.*, 2008). Na inflamação, são responsáveis principalmente pelo aumento na permeabilidade vascular (o que gera edema) e pela eosinofilia (HOLGATE; BRADDING; SAMPSON, 1996; BLEWETT *et al.*, 2008).

2.1.2 Macrófagos e a resposta inflamatória

Os macrófagos desempenham funções de fagocitose e síntese nos tecidos. Estas células são particularmente numerosas no tecido inflamado, e são derivados dos monócitos circulantes do sangue que migram para o tecido por quimiotaxia. O núcleo desta célula é caracterizado por invaginações de tamanhos variados, e uma zona intensa de condensação de cromatina pode ser vista em sua periferia. O Complexo de Golgi é bem desenvolvido e numerosas vesículas estão presentes no citoplasma. Restos de materiais

fagocitados são encontrados nas vesículas lisossômicas, denominadas fagossomos. Além disso, há um grande número de microvilosidades na periferia da célula, que auxiliam na projeção em direção ao material a ser fagocitado (LINDHE *et al.*, 2010).

A atividade fagocitária destas células é aumentada por apresentarem na superfície receptores para a porção Fc da IgG, o que promove o contato dos antígenos com a célula, ativando-a. Porém, atuam também sem especificidade com antígenos, o que permite a capacidade de destruição de um grupo diverso de bactérias antigenicamente não-relacionado (CARRANZA, 1992).

Os macrófagos são as células-chave do sistema imune inato envolvido na progressão da doença periodontal de uma condição aguda para uma patologia crônica, estando presentes em maiores quantidades em lesões periodontais ativas do que em inativas (CARRANZA, 1992). Estas células são importantes fontes de citocinas, incluindo IL-1 β e TNF- α , as quais estimulam a ativação da imunidade celular, além de amplificar a cascata inflamatória e contribuir para a destruição do tecido do hospedeiro. Além disso, em resposta à presença de micro-organismos, macrófagos liberam IL-12, que age estimulando a atividade antibacteriana dos próprios macrófagos, induzindo-os à atividade fagocitária (CHOMYSZYN-GAJEWSKA *et al.*, 2002). Os macrófagos são também reconhecidamente produtores da citocina pró-inflamatória IL-17, que tem papel-chave na indução da cascata de liberação de outras citocinas produzidas e liberadas por diversas células gengivais, como os fibroblastos e os próprios macrófagos (BENKLEN *et al.*, 2007). Somado a isso, outros fatores como IL-1, TNF- α , PGE₂ e óxido nítrico também estão envolvidos com a reabsorção óssea observada na periodontite (YOUNES *et al.*, 2009).

Estudos mostram que células inflamatórias sempre estão presentes no tecido gengival conectivo, porém variam em número e função nos diferentes estágios da inflamação. O número de monócitos/macrófagos aumenta constantemente nos diferentes estágios patológicos, sugerindo que estas células estão bastante relacionadas com o curso da doença periodontal (BENKLEN *et al.*, 2007). Um importante fator de risco para o desenvolvimento da periodontite é o uso de tabaco. Apesar do mecanismo desta relação ainda não estar totalmente claro, estudos recentes utilizando análises de DNA de

macrófagos da região periodontal mostram que diversos genes são diferencialmente expressados em resposta à nicotina, causando resposta inflamatória exacerbada e portanto, distúrbios nos mecanismos de defesa contra os patógenos (BALDI *et al.*, 2009).

O uso de macrófagos, notadamente através de células RAW 264.7, é um importante método de avaliação de atividade anti-inflamatória *in-vitro*, classicamente utilizado na avaliação do efeito terapêutico de plantas medicinais. Através da estimulação destas células com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), ocorre uma elevação na expressão de mediadores químicos da inflamação como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, as quais podem ser quantificadas e correlacionadas com o efeito anti-inflamatório da planta em estudo (NAHAR *et al.*, 2014).

2.1.3 Plantas medicinais com atividade anti-inflamatória

2.1.3.1 *Malva sylvestris*

M. sylvestris, (Figura 2), é uma planta medicinal popularmente conhecida no Brasil como malva, malva-grande, malva-das-boticas, malva-verde, rosa-chinesa ou rosa-marinha. É uma planta da família das malváceas que cresce em diversos tipos de solo, sendo nativa da Europa e Ásia, porém encontrada facilmente nas latitudes subtropicais e temperadas de ambos os hemisférios (SLEIMAN; DAHER, 2009).



FIGURA 2 – PARTES AÉREAS DA *M. sylvestris*

NOTA: (A) Inflorescências

(B) Folhas jovens

(C) Frutos imaturos

FONTE: Adaptado de (BARROS *et al.*, 2010)

O uso de diversas partes desta planta é vastamente conhecido, e suas atividades farmacológicas são amplas. Dentre todas as ações, destaca-se o uso como anti-inflamatório no tratamento de complicações respiratórias, do sistema urinário e inflamações da mucosa oral (PIERONI *et al.*, 2004; GUARRERA *et al.*, 2005). A importância da utilização da *M. sylvestris* no combate a processos inflamatórios de boca e garganta foi reconhecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da publicação da RDC Nº 10, de 09 de março de 2010. Esta resolução regulamenta o uso de plantas medicinais de uso tradicional popular no Brasil e traz em seu anexo uma lista com dezenas de espécies que são de venda livre no país. Neste sentido, o uso da *M. sylvestris* é recomendado sob a forma de infusão, administrando-a oral ou topicamente (BRASIL, 2010).

Estudos realizados até o momento mostram que o efeito anti-inflamatório das folhas da *M. sylvestris* pode ser devido a diversos fatores, tais como a atividade anti-complemento (TOMODA *et al.*, 1989); atividade antioxidante, que bloqueia a ação de radicais livres responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos e neutrófilos (CONFORTI *et al.*, 2008) ou diminuição das enzimas mieloperoxidase (MPO) e *N*-acetil-glicosaminidase (NAG), relacionadas com a quimiotaxia de células de defesa (PRUDENTE *et al.*, 2013). Além disso, foi demonstrado que, em diferentes partes da planta, estão presentes vários flavonóides que reconhecidamente apresentam atividade anti-inflamatória. Desse modo, folhas e flores de *M. sylvestris* mostraram teores significativos de genisteína, miricetina, apigenina, quercetina e campferol (SIKORSKA; MATLAWSKA; FRANSKI, 2004; ALESIANI *et al.*, 2007).

Em virtude da grande variedade de informações envolvendo esta espécie, uma revisão envolvendo aspectos farmacológicos, etnobotânicos, agrônômicos e fitoquímicos foi realizada e publicada em forma de artigo, objetivando contextualizar os avanços realizados até o momento e colaborar com futuras pesquisas sobre o tema (GASPARETTO *et al.*, 2012).

2.1.3.2 *Sida cordifolia*

A família malvácea compreende aproximadamente 120 gêneros e 2000 espécies espalhadas por diversas regiões do mundo. O gênero *Sida* é o terceiro mais diversificado desta complexa família, apresenta em torno de 250 espécies dentre as quais se destaca a *S. cordifolia*. Esta planta é largamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, sendo facilmente encontrada ao longo de estradas e campos baldios em localidades de altitude inferior a 1000 metros, crescendo em muitos locais como uma planta daninha (NUNES *et al.*, 2006; JAIN *et al.* 2011). Originária da Índia, onde é conhecida como “Bala”, *S. cordifolia* é tradicionalmente utilizada na medicina ayurvédica há mais de 3000 anos no tratamento e prevenção de diversas doenças, tendo presença marcante na cultura indiana. Considerada como afrodisíaca, é historicamente utilizada em conjunto com outras drogas em uma preparação denominada “*Divya Yauvanamrita Vati*”, utilizada contra debilidades sexuais, impotência e infertilidade (SAMY *et al.*, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2011). Muito popular também em diversas regiões da África, tem papel relevante na saúde de grande parte da população, na medida em que é utilizada no tratamento de malária, varíola e infecções bacterianas, doenças frequentemente encontradas nestas localidades (KONATÉ *et al.*, 2012). A planta inteira exhibe propriedades terapêuticas, mas em geral os efeitos farmacológicos são relacionados às folhas e às raízes, especialmente devido a presença de alcalóides, esteróides, flavonóides e saponinas (SUTRADHAR *et al.*, 2008). Ocorre abundantemente também nas regiões tropicais das Américas, adaptando-se muito bem ao Brasil onde é encontrada em todas as regiões. Destaca-se seu uso como planta medicinal na região nordeste, onde é conhecida como “malva-branca” (NUNES *et al.*, 2006).

Cresce como um arbusto de até dois metros de altura, as folhas se apresentam com coloração verde-clara e com formato cordado ou ovalado. Apresenta poucas raízes laterais, tendo o eixo principal na fase adulta um tamanho de 5 a 15 cm. Os frutos, que apresentam um par de arestas em cada carpelo, são pequenos (de 6-8 mm), e as flores, de cor branca ou levemente amarelada, aparecem isoladas ao longo da planta. É praticamente inodora e possui um sabor ligeiramente amargo (PAWA *et al.*, 2011).

A *S. cordifolia* é utilizada na medicina tradicional em diversas funções, como antireumática, antipirética, laxativa, diurética, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, hepatoprotetora, anti-parkinsoniana, adaptogênica, hipoglicemiante e hipotrigliceridemiante (KUBAVAT; ASDAQ, 2009; JAIN *et al.*, 2011). Além disso, também possui atividade como antiviral, antibacteriana e antifúngica, sendo aplicada em casos de disenteria crônica, gonorréia e desordens urinárias bacterianas (SUTRADHAR *et al.*; 2006). Nos últimos anos, estudos avaliaram a sua atividade contra doenças cardiovasculares e respiratórias, principalmente em função da presença de aminas simpatomiméticas como efedrina e pseudoefedrina (potentes vasoconstritores), e alcalóides quinazolínicos como vasicinona, vasicinina e vasicinol (hipotensores com comprovada atividade broncodilatadora) (FRANZOTTI *et al.*, 2000; KUBAVAT; ASDAQ, 2009, MEDEIROS *et al.*, 2006). Efedrina e pseudoefedrina são também conhecidas como estimulantes do sistema nervoso central, e apesar de apresentarem-se em baixas concentrações nas folhas (menos de 2% em peso), o uso excessivo de *S. cordifolia* pode levar a efeitos colaterais como insônia, ansiedade, nervosismo, aumento da pressão arterial, perda de memória e até mesmo infarto. Além disso, tal propriedade pode auxiliar na perda de peso e emagrecimento, e devido à potencial aplicação em práticas esportivas no que tange ao aumento da performance física, foi banida como suplemento alimentar em diversos países como EUA e Inglaterra. Em função dos efeitos broncodilatadores da vasicinona, vasicina e vasicinol, a planta também é utilizada no tratamento de afecções brônquicas, especialmente no que se refere à tosse, asma, bronquite, congestão nasal e gripe (JAIN *et al.* 2011). Em doenças cardíacas, a presença destas substâncias hipotensoras faz da *Sida cordifolia* uma planta de interesse para o tratamento de infarto do miocárdio, auxiliando na vasodilatação e bradicardia (KUBAVAT; ASDAQ, 2009). Adicionalmente, o óleo de *S. cordifolia* é usado de forma tópica contra dores musculares e nas articulações, principalmente em casos de reumatismo e artrite, e a partir das folhas são elaborados cataplasmas que auxiliam na cicatrização de feridas e no alívio de dores (JAIN *et al.* 2011). Em algumas regiões da Índia, altas doses de extratos aquosos de

S. cordifolia são utilizadas como abortíferas, tendo inclusive este efeito sido comprovado através de estudos teratogênicos em ratos (NATH *et al.*, 1992).

2.1.3.3 *Pelargonium graveolens*

O gênero *Pelargonium*, pertencente à família geraniaceae, compreende em torno de 270 espécies. Dentre as espécies mais conhecidas destaca-se o *P. graveolens*, que é uma planta sub-arbustiva originária do sul da África e introduzida na Europa no século XVII, em função de sua utilidade como condimento alimentar. Disseminou-se facilmente por todas as regiões do mundo, sendo cultivado como planta de jardim, principalmente por sua atividade como repelente de mosquitos (CAVAR; MAKSIMOVI, 2012).

Apresenta-se geralmente com tamanho inferior a um metro de altura e cresce muito bem em climas tropicais e subtropicais, propagando-se facilmente através de cortes no caule (RANA *et al.*, 2012). Os caules são peludos e herbáceos quando jovens, tornando-se lenhosos com o avanço na idade da planta. As folhas, que apresentam incisões profundas, são aveludadas, simples, alternas, apresentando de 3 a 7 lóbulos recortados e com nervuras salientes. São macias ao toque devido à presença de numerosos pêlos glandulares. As flores variam do rosa ao púrpura claro, com inflorescências contendo de 5 a 10 flores; as pétalas superiores são pequenas, com pontas arredondadas ou recortadas, e os estames possuem anteras pequenas que raramente possuem pólen (MILLER, 2002; PETERSON *et al.*, 2006).

No Brasil, o *P. graveolens* é vulgarmente conhecido como gerânio ou “malva-cheirosa”. É utilizado tradicionalmente pela população do sul do país, como planta aromática no consumo de chimarrão e contra sintomas da gripe, dor de estômago e dor de garganta (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006). Em outros países, tais como Argélia, Madagascar, Marrocos, Índia, Espanha e França, têm-se dado uma grande importância econômica ao seu cultivo em função da obtenção do óleo essencial, conhecido como “óleo de gerânio” (RANA *et al.*, 2012). Estima-se que a produção mundial de óleo de gerânio ultrapasse 700 toneladas ao ano (SAXENA *et al.*, 2008), atendendo principalmente aos mercados da indústria farmacêutica, cosmética, de

aromaterapia e de alimentos, devido a sua característica fragrância que se assemelha à de pétalas de rosas (CAVAR; MAKSIMOVIC, 2012). Esta marcada propriedade olfativa do óleo está relacionada com a presença de elevadas quantidades de um monoterpenóide cíclico denominado “rosa óxido” [*cis*- e *trans*-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-tetrahidropirano], que é amplamente utilizado na indústria de perfumaria (WÜST *et al.*, 1998).

O conteúdo de óleo por peso de planta varia entre 0,15-0,18% (p/p), apesar de existirem significativas variações em sua composição, que dependem especialmente do cultivar e das condições de cultivo (CAVAR; MAKSIMOVIC, 2012). Mais de 90 substâncias foram identificadas através de cromatografia gasosa, sendo os principais constituintes o citronelol (28,7-50,8%), geraniol (21,2-1,6%), formiato de citronelila (5,1-12,5%), isomentona (7,1-10,3%), eudesmol (4,5-5,0%). Além destes, destaca-se também a presença de linalool, p-mentona, α -humuleno, α -selineno, formiato de geranil e 6,9-guaiadieno (SAXENA *et al.*, 2008; RANA *et al.*, 2012; CAVAR; MAKSIMOVIC, 2012). O óleo essencial de *P. graveolens* tem sido historicamente utilizado no tratamento de disenteria, hemorróidas, inflamações, intensos fluxos menstruais e até mesmo câncer. Há relatos também de uso no tratamento contra a diabetes, problemas de vesícula, úlceras gástricas, icterícia, problemas de fígado, esterilidade e cálculos urinários. Na medicina tradicional chinesa, é utilizado para abrir o chakra do fígado e promover a expulsão de toxinas que dificultam a realização do equilíbrio do organismo (PETERSON *et al.*, 2006). Estudos mostraram que o óleo essencial também apresenta excelente atividade antibiótica, inclusive aumentando o espectro de ação quando da administração sinérgica com antibióticos já amplamente estabelecidos (ROSATO *et al.*, 2007). Além disso, têm sido utilizado no tratamento de pitíriase versicolor em função de sua atividade contra fungos do gênero *Malassezia sp.* (NAEINI *et al.*, 2011).

2.1.4 Métodos analíticos para análise de mediadores inflamatórios

Metodologias de identificação e quantificação de mediadores da inflamação do tipo eicosanóide, tanto em cultivos celulares como em meios

biológicos são descritos na literatura desde o final da década de 1950 (HAMILTON; KAROL, 1982). Técnicas como cromatografia em coluna aberta, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta (UV) ou por fluorescência, cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar, análises imunoenzimáticas e radioimunoensaios, foram no passado avaliadas por diversos autores (MASOODI; NICOLAOU, 2006; BLEWETT *et al.*, 2008). Porém, todas elas possuem significativas desvantagens na medida em que requerem a existência de cromóforos (no caso de detecções por UV), exigem complexas e demoradas derivatizações de moléculas (no caso do uso de CG) e possuem baixa sensibilidade para detectar metabólitos endógenos, complicando o preparo de amostras e introduzindo erros na análise (BLEWETT *et al.*, 2008). Além disso, técnicas que envolvem detecção por UV são dificultadas na medida em que eicosanóides absorvem em baixos comprimentos de onda, tornando a análise muito inespecífica (MASOODI; NICOLAOU, 2006).

Portanto, se fazia necessário o desenvolvimento de um método simples, sensível e seletivo para identificação e quantificação destes mediadores. Desse modo, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial (CLAE-EM/EM) surgiu como uma valiosa ferramenta, permitindo análises quantitativas muito precisas e a obtenção de um perfil simultâneo de várias classes de eicosanóides (MASOODI; NICOLAOU, 2006; BLEWETT *et al.*, 2007).

Quando analisados por CLAE-EM/EM, eicosanóides facilmente formam moléculas protonadas ou desprotonadas. O uso de ionização por *Eletrospray* (ESI) permite análises sem a necessidade de derivatização ou demoradas preparações de amostra, além de oferecer alta versatilidade, sensibilidade e seletividade. ESI é muito aplicada nestas análises em função dos eicosanóides possuírem carboxilatos livres, resultando em abundantes íons $[M-H]^+$, que permite detecções mesmo em baixas concentrações (MASOODI; NICOLAOU, 2006).

2.2 QUIMIOMETRIA

O interfaceamento de instrumentos de química analítica a computadores levou a um grande aumento no volume dos dados obtidos, sendo estes cada vez mais complexos e variados. De posse de tal quantidade de dados, surgiu a necessidade de ferramentas para tratá-los e extrair o máximo de informações relevantes. Dessa forma nasceu a quimiometria, uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada (FERREIRA *et al.*, 1999). A quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, químicos e estatísticos para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico. Dentre as diversas subáreas da quimiometria, destacam-se o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória, classificação de amostras e resolução de curvas) e a calibração multivariada (NETO *et al.*, 2006).

O planejamento de experimentos visa encontrar as variáveis que mais afetam um processo; o reconhecimento de padrões busca, a partir de uma grande quantidade de informações químicas, encontrar agrupamentos de objetos que são similares entre si detectando tendências nos dados; e a calibração multivariada busca relacionar medidas químicas ou espectrais com determinadas propriedades, como concentrações (DE SOUZA; POPPI, 2012). Desta forma, as técnicas quimiométricas podem ser genericamente divididas em três classes: análise exploratória de dados, construção de modelos quantitativos de calibração e construção de modelos qualitativos de classificação (SCHIMLECK *et al.*, 1996). Nos estudos quimiométricos, as medidas obtidas são organizadas em tabelas (matriz **X**), onde cada linha se refere a uma observação (amostra) e as colunas representam as variáveis ou fatores medidos (por exemplo, intensidade de relação massa/carga para EM, números de onda para IV, entre outros) (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007).

Nas análises de reconhecimento de padrões, os dados são inicialmente avaliados por métodos de análise exploratória, que extraem informação e detectam tendências nos dados baseados nas medidas multivariadas das amostras. Além disso, a análise exploratória também possibilita detectar amostras anômalas e estabelecer relações entre as amostras e suas variáveis (NETO *et al.*, 2006).

As análises exploratórias podem ser divididas em métodos supervisionados e não supervisionados. Nos métodos não supervisionados, a separação de classes acontece sem a necessidade de informações iniciais sobre a natureza das amostras e o objetivo é identificar agrupamentos naturais entre elas (DE SOUZA; POPPI, 2012). Dentre os métodos não supervisionados, os mais antigos e amplamente utilizados são a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA). Na PCA, o objetivo é descrever a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um novo conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas Componentes Principais (CPs), as quais contêm as informações mais relevantes dos dados em poucas dimensões (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). O primeiro CP é a combinação linear de máxima variância (isto é, de máxima informação); o segundo CP também é de máxima variância, porém ortogonal ao primeiro; o terceiro CP também é de máxima variância e ortogonal aos dois primeiros CPs, e assim por diante. Como todos esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, muitas vezes a informação relevante fica concentrada nos primeiros CPs, que podem ser então examinadas em busca de padrões (NETO *et al.*, 2006). A partir dos CPs são gerados dois novos conjuntos de dados chamados de escores e *loadings*. Estes dois conjuntos trazem informações sobre as amostras e as variáveis, respectivamente (MATOS *et al.*, 2003). Escores representam a posição de cada objeto no plano gerado pelas novas CPs, e os *loadings* revelam a contribuição que cada variável original exerce sobre uma determinada CP, sendo matematicamente definido como o cosseno do ângulo entre o eixo da variável e o eixo do CP. Se um determinado número de CPs não conseguir descrever toda a variância dos dados, então essa parte não descrita será representada em uma nova matriz chamada de resíduos (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Existem diversos algoritmos para o cálculo dos *loadings* e dos escores, entre eles o *Nonlinear Iterative Partial Least Squares* (NIPALS), o *Singular Value Decomposition* (SVD), o POWER e o *Eigenvalue Decomposition* (EVD). O NIPALS é o mais popular entre eles, onde os *loadings* e os escores são calculados de forma iterativa, iniciando para o primeiro componente principal com uma estimativa de escores, que pode ser a coluna

da matriz que tem a maior variância. Através destes escores, calculam-se os pesos, e este processo se repete até que não haja mais variação significativa no valor dos escores (DE SOUZA; POPPI, 2012).

Dessa forma, a PCA é um método de compressão, que projeta dados multivariados num espaço de menor dimensão (2D ou 3D), possibilitando sua visualização comparativa e melhor interpretação. A Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) é utilizada para analisar a estrutura do conjunto de dados em termos de grupos definidos de maneira hierárquica, de acordo com a similaridade entre objetos ou variáveis. Embora existam muitas variantes matemáticas, o que define a similaridade entre dois pontos é a distância entre eles no espaço multidimensional. Quanto menor essa distância, maior a similaridade entre os objetos (NETO *et al.*, 2006). Existem diversas formas de se calcular as distâncias interpontos associados às amostras ou variáveis, como por exemplo a distância de Mahalanobis, distância Euclidiana, distância de Chebychev, coeficiente de correlação de Pearson, entre outros. A maneira matematicamente mais simples é através da distância Euclidiana, que consiste em agrupar os pares de pontos que estão mais próximos e substituí-los por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles. Este procedimento, quando repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, leva a construção do gráfico bidimensional que representa a HCA denominado *dendrograma*, onde, no eixo horizontal são colocadas as amostras e, no eixo vertical, o índice de similaridade. Os dendrogramas, portanto, consistem em diagramas que representam a similaridade entre pares de amostras (ou grupos de amostras) numa escala que vai de um (identidade) a zero (nenhuma similaridade) (NETO; MOITA, 1998).

Os métodos supervisionados de reconhecimento de padrões são aqueles onde é necessário que exista alguma informação inicial sobre a identidade das amostras para a formação das classes (o chamado conjunto de treinamento). O objetivo é desenvolver um modelo baseado nas informações contidas nas amostras, no sentido de classificá-las. Dentre estes métodos, podem ser incluídos o *Linear Discriminant Analysis* (LDA), *K-Nearest Neighbor* (KNN), *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA) e *Soft-Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) (DE SOUZA; POPPI, 2012;

NETO *et al.*, 2006). O método SIMCA usa a PCA para construir separadamente um modelo para cada classe do conjunto de treinamento. Uma vez estabelecidos, os modelos são usados para classificar novas amostras (as amostras do conjunto de teste). O método KNN faz a classificação de acordo com a similaridade que a amostra desconhecida apresenta em relação às amostras do conjunto de treinamento (NETO *et al.*, 2006). O método PLS-DA provém originalmente do PLS (*Partial Least Squares*), o qual não foi criado para avaliar problemas de classificação e discriminação, mas sim com intuitos quantitativos (BARKER; RAYENS, 2003). Neste método, muito utilizado no estudo de biomarcadores metabólicos, a variável dependente (vetor y) é utilizada para definir as classes das amostras do estudo, através da atribuição de valores (-1, 0, 1, etc). (SZYMANSKA *et al.*, 2012). Esta matriz Y é então relacionada com os escores da matriz X (variáveis independentes), e a diferenciação é então alcançada através de uma regressão obtida com os mínimos quadrados parciais dos escores da matriz X (BARKER; RAYENS, 2003).

2.2.1 Pré-tratamentos de dados

Antes das análises quimiométricas serem realizadas, na maioria das vezes é necessário que os dados originais recebam algum tipo de pré-tratamento (MATOS *et al.*, 2003). A etapa de pré-tratamento dos dados é fundamental para o sucesso da análise multivariada. Os principais objetivos da aplicação das técnicas de pré-tratamento são eliminar informações não relevantes do ponto de vista químico e tornar a matriz de dados melhor condicionada para a análise, possibilitando a subsequente análise exploratória do conjunto de dados com eficiência (De SOUZA; POPPI, 2012). Além disso, minimizam variações que podem ocorrer devido à instabilidade do instrumento, ao espalhamento da radiação durante a realização das medidas (no caso do uso de IV e UV), ou ainda devido à variabilidade das propriedades físicas das amostras (SIMÕES, 2008).

Existem dois tipos de pré-tratamentos dos dados: as transformações, que são aplicadas às amostras (linhas da matriz X) e os pré-processamentos,

que são aplicados às variáveis (colunas da matriz \mathbf{X}). As técnicas de transformação são aplicadas para minimizar ou eliminar variações aleatórias e sistemáticas (por exemplo podem ser citados o alisamento, correções de linha de base, alinhamento) ou para uniformizar o conjunto de dados (por exemplo o uso de logaritmo, normalizações, correção multiplicativa de sinal, transformada de Fourier, aplicação de derivadas, etc). Já os pré-processamentos mais utilizados são a centragem dos dados na média e o autoescalamento. Centrando os dados na média, os valores de cada variável são subtraídos de sua média obtida com todas as amostras. Assim, a média das variáveis pré-processadas será igual a zero. No autoescalamento, o valor de cada variável é subtraído da média, e então dividido pelo desvio padrão; a média será igual a zero e o desvio padrão será igual a um. A centragem na média é muito utilizada em dados espectroscópicos (IV e UV), enquanto que o autoescalamento é usado quando se quer atribuir a mesma importância a todas as variáveis (MARTINS, 2008).

É importante salientar que a escolha da técnica de pré-processamento é uma etapa crítica da modelagem, pois a mesma pode influenciar tanto positiva quanto negativamente no desempenho do modelo (BEEBE *et al*, 1998).

2.2.2 Métodos de classificação: PLS-DA

As técnicas de reconhecimento de padrões supervisionadas relacionam a resposta instrumental com índices de classes, de tal forma que modelos multivariados podem ser obtidos para classificar amostras desconhecidas (CASTRO; PRADO, 2002). Diversos métodos de reconhecimento de padrões supervisionados têm sido utilizados em problemas analíticos de classificação, e dentre eles destaca-se a análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS-DA - *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*).

O PLS-DA baseia-se no método de regressão PLS para construção de modelos preditivos que buscam relacionar as respostas instrumentais (\mathbf{X}) com as propriedades de interesse, ou variáveis de resposta (\mathbf{Y}), utilizando os rótulos das classes como um vetor dependente “y” (PEERBHAY *et al.*, 2013). O algoritmo PLS2 é utilizado quando mais de duas classes estão envolvidas na

classificação. Como todo método de reconhecimento de padrões, é necessário construir um modelo matemático através de um conjunto de amostras de treinamento, o qual é validado através de outro conjunto de amostras independente. Só então os procedimentos de validação externa são realizados, para que então o modelo possa ser utilizado para classificação de amostras desconhecidas (BOFFO *et al.*, 2009).

O PLS-DA fornece ferramentas estatísticas para avaliar tanto a concordância entre julgadores e a discriminação entre os produtos por meio da variância total, quanto a importância relativa de cada variável, permitindo a seleção de um subconjunto de atributos relevantes do conjunto completo de atributos, por meio do índice *VIP* (*Variable Importance in the Projection*). O resultado é expresso na forma de matrizes de confusão, que fornecem o número de amostras classificadas em cada categoria pré-determinada, de acordo com a matriz **Y**.

Métodos de classificação do tipo PLS-DA tem sido utilizados em conjunto com dados espectroscópicos na discriminação de diferentes tipos de cultivares de arroz (LIN *et al.*, 2012); na classificação, verificação da autenticidade e na comparação em função do tempo de armazenamento de diferentes tipos de azeites obtidos com azeitonas típicas da região do Marrocos (TEROUZI *et al.*, 2011); na avaliação da deterioração fisiológica de mandiocas durante a pós-colheita, no sentido de supervisionar as mudanças na sua qualidade em função do teor de compostos fenólicos totais, carotenóides, flavonóides e antocianinas (UARROTA *et al.*, 2014); na avaliação da adulteração de óleo de côco com óleos de milho e de girassol (ROHMAN; MAN, 2011).

2.2.3 O uso da quimiometria no controle de qualidade de plantas medicinais

Dada a grande variedade de plantas medicinais disponíveis no mercado, alguns problemas decorrentes da desinformação ocorrem em função da comercialização de material vegetal sem controle, tanto na qualidade como na validade. Os nomes populares das plantas confundem tanto os consumidores como os vendedores, pois variam de uma região para outra, mesmo se

tratando de uma mesma espécie botânica. Dessa forma o uso de análises químicas dos extratos de plantas medicinais com técnicas instrumentais rápidas, de alta precisão, exatidão e versatilidade, torna-se indispensável na certificação de origem e nos controles de qualidade e de processo (GOBBONETO; LOPES, 2007).

Apesar do amplo uso de plantas medicinais em diversas regiões, a qualidade e a quantidade de dados sobre o controle de qualidade não são suficientes para embasar um uso seguro e eficaz das mesmas. Uma das razões para a falta de metodologia no controle é a existência de grande quantidade de compostos químicos neste tipo de matriz. Isso torna difícil a identificação de marcadores que proporcionam o efeito farmacológico, o qual muitas vezes é obtido somente através da interação entre diversos compostos (GAN; YE, 2006). Esta grande variação na constituição química ocorre inclusive quando se tratam de plantas de uma mesma espécie que são obtidas em diferentes localidades, climas, épocas de colheita, tipos de solo, idades e condições de armazenamento. Outra dificuldade para a implantação de controle de qualidade em plantas é a diferenciação entre espécies, notadamente quando estas apresentam semelhança morfológica ou com distinções sutis somente em determinadas épocas, como na floração. Geralmente, é necessário algum tipo de diferenciação quando uma das plantas possui interesses farmacológicos ou econômicos, evitando assim problemas com falsificações (MAREE; VILJOEN, 2011). Dessa forma, análises de marcadores únicos muitas vezes não são suficientes para a adequada identificação de uma planta, e portanto, é de grande importância formular protocolos de controle de qualidade baseados no metaboloma da planta (CHUN *et al.*, 2011).

Assim, têm-se intensificado o uso de “impressões digitais” (*fingerprints*) do perfil metabolômico de plantas para checar a autenticidade ou promover o controle de qualidade. Diversas técnicas podem ser citadas para a obtenção destes perfis, incluindo a cromatografia líquida (CHEN *et al.*, 2008), a infusão direta por espectrometria de massas (BIASOLI *et al.*, 2011), análises por ^1H NMR (REZZI *et al.*, 2005), a espectrometria por infravermelho médio e próximo (MAREE; VILJOEN, 2011) e a cromatografia gasosa (CG). Invariavelmente,

estas técnicas fornecem como resultado cromatogramas e espectros multivariados de alta complexidade e difícil análise, onde diferenças muito sutis podem ser responsáveis pela diferenciação entre espécies (CHENet *et al.*, 2008). Dessa forma, alguns métodos têm sido propostos para avaliar diferenças e/ou similaridades entre plantas medicinais através da análise dos *fingerprints* (GAN; YE, 2006).

Métodos de reconhecimento de padrões químicos utilizando estatística multivariada, tais como PCA, SIMCA, PLS-DA, etc, tem sido amplamente utilizados com sucesso na análise de diferentes tipos de plantas medicinais, não somente para discriminar diferentes tipos de plantas como também as diferentes localidades de onde foram obtidas, facilitando assim o controle de qualidade (CHEN *et al.*, 2008). Adicionalmente, HCA tem sido utilizada para distribuir amostras em grupos em função de similaridade metabólicas e genéticas (CHUN *et al.*, 2011). A quimiometria tem ainda ajudado diversos pesquisadores a encontrar padrões de biomarcadores em plantas de determinadas linhagens, bem como em estudos farmacológicos e toxicológicos (ZENG *et al.*, 2007).

Como exemplo, podem ser citados os trabalhos de LI *et al.* (2004), que propôs o uso de PCA e LSS (*Local least square*) para desenvolver controle de qualidade em Plantas da Medicina Tradicional Chinesa através de perfis cromatográficos. Adicionalmente, *fingerprints* cromatográficos aliados a análises estatísticas multivariadas foram utilizadas por YI *et al.* (2007) para discriminar dois tipos de tangerinas bastante similares, *Pericarpium citri reticulatae* e *Pericarpium citri reticulatae viride*. Utilizando as técnicas de IV médio e próximo, MAREE & VILJOEN (2011) tiveram sucesso na separação entre *Pelargonium sidoides* (de grande valor comercial) e a espécie *P. reniforme* (de menor valor comercial) utilizando PCA e OPLS-DA. Também utilizando FT-NIR, XIE *et al.* (2007) obtiveram resultados excelentes na identificação de tomates transgênicos e não-transgênicos, utilizando PCA, SIMCA e DPLS (*discriminant partial least squares*). Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas serviu como técnica analítica de obtenção de *fingerprints* de *Scutellaria barbata* por PAN *et al.* (2011), que

através de PCA conseguiram distinguir os dois principais adulterantes do óleo essencial desta espécie, *Oldenlandia diffusa* e *Lobelia chinensis*.

2.2.4 Análises de perfil metabólico

Perfil metabólico ou *fingerprint* é a análise de um conjunto de amostras de forma rápida onde um grande número de metabolitos é avaliado. Nestes estudos, não há a intenção de identificar cada metabolito detectado, mas sim comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos que podem variar em resposta a uma doença, exposição a uma toxina, perturbações genéticas ou ambientais, etc, podendo ainda ser identificadas substâncias discriminantes ou biomarcadores (CABRAL, 2010). Um esquema geral da obtenção de um *fingerprint* é mostrado na Figura 3.

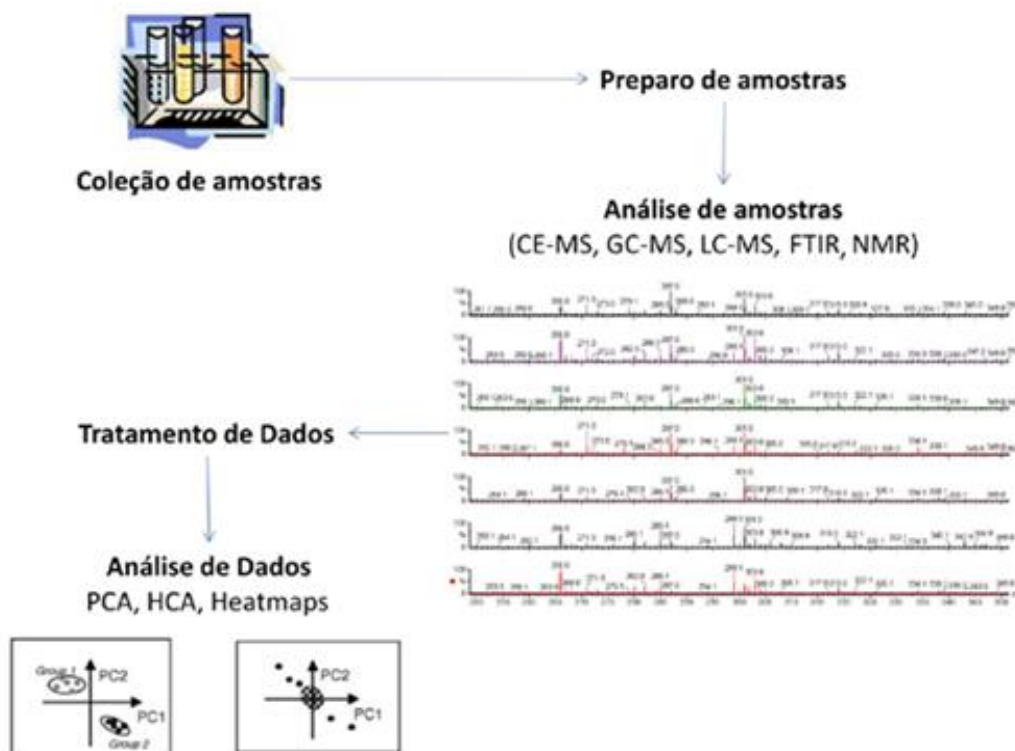


FIGURA 3 – ESQUEMA GERAL DE OBTENÇÃO DE *FINGERPRINTS* METABÓLICOS
 FONTE: Adaptado de: (CABRAL, 2010)

Fingerprints podem ser obtidos a partir de diversos tipos de matrizes biológicas, de natureza humana, animal ou vegetal, como urina, plasma, saliva,

tecidos, células, folhas, etc (CABRAL, 2010). Técnicas hífenadas, as quais acoplam separações por cromatografia gasosa ou líquida à EM, RMN ou DAD, trabalham muito bem com extratos de plantas extremamente complexos e minimamente fracionados. Porém, quando se trata da aquisição de uma grande quantidade de dados, a cromatografia se torna uma desvantagem, pois muita informação pode ser perdida através de substâncias que coeluem ou que eluem em tempos de retenção que não foram avaliados. Em consequência, há um aumento no interesse por análises de plantas sem separação cromatográfica, usando técnicas espectroscópicas tais como RMN, FTIR ou EM. Dada a grande quantidade de dados gerados por estas técnicas (a escala obtida facilmente chega a 10^6 pontos de dados por espectro), os *fingerprints* metabólicos obtidos geralmente requerem interpretação quimiométrica multivariada, como por exemplo pela PCA (GOODACRE *et al.*, 2003; McDOUGALL *et al.*, 2008).

2.2.4.1 Análises metabólicas de plantas por espectroscopia no IV

O controle de qualidade é essencial na indústria farmacêutica, para garantir a qualidade e, principalmente, a autenticidade dos produtos. Porém quando se trabalha com plantas medicinais, este controle é bastante desafiador dada a variedade de constituintes presentes nestas matrizes, aliada a grande influência exercida por fatores como tipo de solo, localidade, clima, estação e condições de armazenamento (MAREE; VILJOEN, 2011). Assim, o uso de técnicas que auxiliem na discriminação entre espécies relacionadas e/ou adulterantes é muito importante. Além dos métodos de identificação morfo-anatômicos, o perfil metabólico de plantas medicinais obtido por CLAE é convencionalmente utilizada em protocolos de controle de qualidade. Porém a CLAE é demorada, com um custo relativamente alto e requer um analista treinado. Uma alternativa rápida e não destrutiva para a obtenção de perfis metabólicos em plantas é a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (WU *et al.*, 2010), que pode ser utilizada analisando espectros com intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} (infravermelho

médio), de 13000 a 4000 cm^{-1} (infravermelho próximo) ou menores que 400 cm^{-1} (infravermelho distante) (STUART, 2004).

A espectroscopia de transmissão (baseada na absorção de radiação infravermelha por uma amostra, em comprimentos de onda específicos) é o método mais antigo e convencional de obtenção de espectros. Porém, algumas amostras são de difícil análise por este método (como aquelas na forma de pó, de superfície sólida e irregular), e dessa forma a espectroscopia de reflectância pode ser utilizada, onde as propriedades relacionadas à interação da radiação infravermelha com a amostra podem ser obtidas através da luz refletida. Basicamente, neste tipo de espectroscopia, podem ocorrer três tipos de reflectância de acordo com o tipo de superfície do material analisado (espectroscopia de reflectância interna, especular e difusa) (STUART, 2004). Além disso, estes tipos de reflectância inferem em diferentes técnicas de amostragem do material a ser analisado. Destacam-se no controle de qualidade de plantas a de reflectância interna (também denominada de reflexão total atenuada – ATR) e a difusa (conhecida como DRIFTS).

Análises por ATR combinadas com modelos quimiométricos são uma rápida maneira de obter modelos preditivos com o objetivo de obter a concentração de analitos em amostras. Este método oferece vantagens, tais como a simplicidade operacional do instrumento, a reprodutibilidade e a velocidade da obtenção dos dados. Este método tem sido utilizado na detecção de adulterantes em diversos tipos de alimentos, monitoramento de termo degradação de óleos, monitoramento *on-line* de concentração de nutrientes e biomassa durante a produção de antibióticos e na indústria do vinho na distinção de diferentes variedades de uva (SCHMIDTKE *et. al.*, 2012).

2.2.4.2 Análises metabólicas de plantas por infusão direta em espectrômetro de massas (DIMS)

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS), uma técnica de ionização branda, é relativamente pouco explorada na obtenção de *fingerprints* metabólicos de plantas (COLE, 1997). Porém, tem recentemente se tornado uma das mais poderosas técnicas analíticas para o

estudo de compostos polares, termolábeis e hidrofílicos, com aplicação em diversas áreas (ROESLER *et al.*, 2008). Já no final dos anos 1990, SCHRÖDER, (1996) sugeriu que os íons moleculares obtidos em amostras complexas podem ser suficientemente distinguidos por seus valores de m/z sem a necessidade de uma coluna cromatográfica, sendo injetadas amostras não-fracionadas diretamente no ESI-MS ou utilizando injeção por fluxo direto (SCHRÖDER, 1996). As análises por infusão direta são perfeitamente compatíveis e eficientes para a análise de grande número de metabólitos e obtenção de *fingerprints*. Através de técnicas como ESI, o espectro de massas pode ser obtido em segundos, sem nenhum método de separação ou em alguns casos sem preparo de amostra (CABRAL, 2010). ESI-MS é competitiva em termos de velocidade de aquisição de *fingerprints* com técnicas como FT-IR e RMN, além disso é uma ferramenta muito potente e reprodutível para identificar metabólitos específicos (GOODACRE *et al.*, 2003, CABRAL, 2010).

Apesar de bastante robusto, o método por infusão direta possui alguns inconvenientes, como por exemplo a falta de linearidade na resposta da fonte de ionização e o predomínio de certos componentes mais facilmente ionizáveis. Além disso, isômeros não podem ser diferenciados, senão pelo uso de cromatografia, e a formação de íons fragmentos na fonte de ionização deve ser avaliada com cuidado, pois pode aumentar a complexidade do espectro, induzindo a uma interpretação errônea. Entretanto, na ESI-MS, a maior preocupação é a supressão iônica. Uma vez que todos os componentes da amostra são introduzidos simultaneamente na fonte de ionização, a supressão ou o aumento do sinal ocorrem principalmente quando se trata de extratos vegetais, onde os analitos de interesse podem ser facilmente mascarados devido à presença de clorofila (GOODACRE *et al.*, 2003, CABRAL, 2010). Além disso, *fingerprintings* por ESI-MS não fornecem uma visão global do extrato, uma vez que a análise precisa ser dividida entre modo positivo e negativo, fornecendo diferentes conjuntos de metabólitos. Dessa forma, devido a todas estas restrições, a infusão direta deve ser usada somente semi-quantitativamente (MCDUGALL *et al.*, 2008).

ROESLER *et al.*, (2008) estudaram extratos etanólicos de pequi (*Caryocar brasiliense*) por ESI-MS, em busca de substâncias antioxidantes.

Análises no modo negativo e no modo positivo foram realizadas, e inclusive foram propostas estruturas de determinados íons selecionados. Porém, os espectros adquiridos no modo negativo produziram os dados mais significativos, pois este modo proporciona um sensível e seletivo método para a identificação de compostos orgânicos polares com sítios ácidos, incluindo portanto a maior parte dos compostos fenólicos bioativos, ácidos orgânicos e açúcares (ROESLER *et al.*, 2008). GOODACRE *et al.*, (2003) utilizaram extratos de *Pharbitis nil* em diferentes estados fisiológicos, injetados diretamente ESI-MS para obter rapidamente *fingerprints* metabólicos da planta e posteriores separações em função da fisiologia. Mc DOUGALL *et al.*, (2008) estudaram a composição de taninos em amoras, framboesas e morangos através de ESI-MS de extratos brutos e de frações ricas em taninos. A análise foi feita tanto em modo negativo quanto positivo, e revelou a existência de diversas classes de elagitaninos, como sanguiína, nobotanina, lambertianina e ácido elágico. Nos extratos brutos, o espectro retrata a existência de altas concentrações de antocianinas, que se ionizam mais rapidamente e dominam o espectro no modo positivo. Um sinal bastante característico também é o da quercetina glicosilada, que como muitos flavonóides, ionizam bem no modo negativo e dominam o espectro no modo negativo. Dessa forma, os autores mostraram que o método pode ser usado qualitativamente para descrever a diversidade fitoquímica dos polifenóis das frutas analisadas. Apesar de rápido, a análise destas substâncias pelo método ESI-MS precisa ser correlacionado e validado contra outros métodos para confirmação (McDOUGALL *et al.*, 2008). Além destes estudos, a ESI-MS tem revolucionado a forma com que as moléculas são ionizadas e transferidas para o EM para caracterização de massa e estrutura. A injeção direta em ESI-MS tem sido aplicada na obtenção de *fingerprints* de misturas complexas como extratos de araticum (ROESLER *et al.*, 2008), mel (SAWAYA *et al.*, 2004) cerveja (ARAÚJO *et al.*, 2005) e vinho (CATHARINO *et al.*, 2006), entre outros (ROESLER *et al.*, 2008). SCHIOZER *et al.*, (2012) obtiveram êxito na separação de três espécies de *Arrabidaea chica* colhidas em estações chuvosas e secas durante diferentes períodos do dia na região amazônica brasileira, através de *fingerprints* de extratos de folhas

obtidos por infusões direta em ESI-MS e com o auxílio de PLS-DA (SCHIOZER *et al.*, 2012).

2.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE PRODUTOS NATURAIS

Técnicas para a otimização da extração de metabólitos em produtos naturais são comercial e farmaceuticamente importantes e aplicáveis a uma ampla variedade de situações, como por exemplo quando se busca a extração de componentes de alto valor agregado, com o mínimo de impurezas ou isentos de materiais co-extraídos. Além disso, a identificação de novos biomarcadores que possam discriminar espécies botanicamente relacionadas também têm recebido especial atenção. Dessa forma, realização de experimentos estatisticamente planejados são utilizados para minimizar o número de ensaios (economizando materiais, tempo de analistas e uso de equipamentos), bem como para identificar efeitos de interação entre fatores experimentais que possam ser importantes para a otimização da extração (SOARES; BRUNS; SCARMÍNIO, 2007)

De especial interesse na extração de produtos naturais, os metabólitos secundários de plantas, representam uma fonte biogênica extremamente rica para a descoberta de novas drogas ou para o desenvolvimento de novos medicamentos. Classicamente, estes metabólitos são extraídos do material vegetal seco através de extração contínua com uma ampla gama de solventes, como por exemplo o etanol que extrai um grande número de flavonóides; acetato de etila e algumas cetonas, que seletivamente extraem terpenóides; misturas aquosas de metanol e etanol, que extraem polifenóis (LONNI *et al.*, 2012). Contudo, raramente se obtém uma completa separação dos constituintes, quando do uso de solventes puros (HARBORNE, 1984). Assim, métodos estatísticos e sistemáticos que avaliem o efeito da mudança nas proporções dos solventes, considerando inclusive misturas ternárias e quaternárias, permitem o desenvolvimento de procedimentos que levam ao aumento no rendimento da extração de um metabólito de interesse (SOARES; BRUNS; SCARMÍNIO, 2007; SOARES; BRUNS; SCARMÍNIO, 2009). A

construção destes modelos de misturas permite a identificação e caracterização de interações sinérgicas e antagônicas entre os solventes, até que uma proporção ótima seja obtida.

2.3.1 Planejamentos experimentais do tipo Centróide Simplex e modelos de superfícies de resposta obtidos com misturas

Os planejamentos experimentais para o estudo de misturas apresentam uma importante característica: a soma das proporções de todos os componentes deve ser sempre 100%, podendo ser escritas da forma como mostra a Equação 1.

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad (\text{Equação 1})$$

, onde x_i representa a proporção do i -ésimo componente. Para uma mistura binária, a equação reduz-se a $x_1 + x_2 = 1$ (cuja equação representa uma reta, e as possíveis misturas correspondem a pontos sobre esta reta); para misturas com três fatores, a equação obedecerá a restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$ (cuja equação define um espaço experimental que limita-se aos pontos pertencentes a um triângulo, como na Figura 4). Os vértices correspondem aos componentes puros; os lados correspondem às misturas binárias e os pontos situados no interior do triângulo representam as misturas de três componentes (NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001).

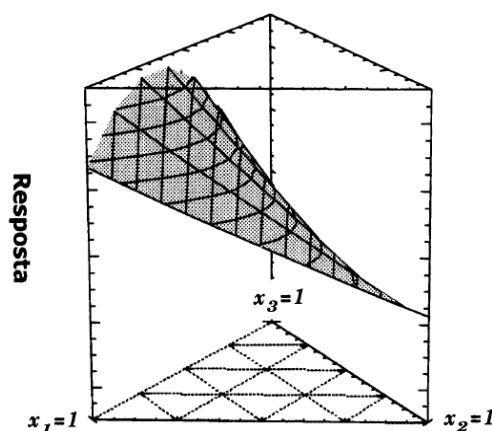


FIGURA 4 – UMA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA TODAS AS POSSÍVEIS MISTURAS DE TRÊS COMPONENTES

FONTE: Retirado de: NETO; SCARMÍNIO; BRUNS (2001)

Dessa forma, o modelamento de misturas consiste em ajustar um modelo matemático polinomial a uma superfície de resposta obtida segundo um planejamento experimental específico, conhecido como planejamento estatístico de misturas. Este planejamento envolve um número exato de experimentos (necessários para o ajuste do modelo matemático escolhido), sendo realizados com componentes puros e com misturas de composição variada (COSCIONE; ANDRADE; MAY, 2005).

Em função da composição da mistura, é possível postular modelos que descrevam alguma propriedade de interesse. Considerando um modelo de mistura com três componentes, o mais simples é o linear (Equação 2):

$$\hat{y} = b^*_1x_1 + b^*_2x_2 + b^*_3x_3 \quad (\text{Equação 2})$$

, sendo $b^*_i = b_0 + b_i$ (para $i = 1, 2$ e 3), onde \hat{y} é um valor experimental da resposta de interesse, b_1 , b_2 e b_3 são os parâmetros do modelo e x_1 , x_2 e x_3 são as proporções de cada parâmetro na composição. Caso o modelo linear não seja satisfatório, um modelo quadrático (Equação 3) poderá ser ajustado às respostas experimentais:

$$\hat{y} = b^*_1x_1 + b^*_2x_2 + b^*_3x_3 + b^*_{12}x_1x_2 + b^*_{13}x_1x_3 + b^*_{23}x_2x_3 \quad (\text{Equação 3})$$

onde $b^*_i = b_0 + b_i + b_{ii}$ e $b^*_{ij} = b_{ij} - b_{ii} - b_{jj}$ (para $i \neq j$). Percebe-se que para elaborar um modelo quadrático, bastam seis experimentos distintos (três com cada componente puro e três com misturas entre dois componentes). Os planejamentos experimentais representados por seis pontos são chamados de planejamentos em rede simples (*simplex lattice design*).

A avaliação de efeitos envolvendo a presença simultânea de três componentes pode ser importante para descrever a resposta de modelos ternários, e assim, modelos quadráticos serão insuficientes, já que não envolvem a mistura de três termos. Dessa forma, poderá ser ajustado um modelo cúbico especial (Equação 4) às respostas experimentais:

$$\hat{y} = b^*_1x_1 + b^*_2x_2 + b^*_3x_3 + b^*_{12}x_1x_2 + b^*_{13}x_1x_3 + b^*_{23}x_2x_3 + b^*_{123}x_1x_2x_3 \quad (\text{Equação 4})$$

, onde o último termo ($b^*_{123x_1x_2x_3}$) refere-se a um ponto central correspondendo a mistura ternária em partes iguais (x_1, x_2, x_3) = (1/3, 1/3, 1/3). Este planejamento experimental, empregando coeficientes de um modelo cúbico especial, é chamado de centróide simplex, cuja imagem representativa (para misturas com três ou quatro fatores) é mostrada na Figura 5.

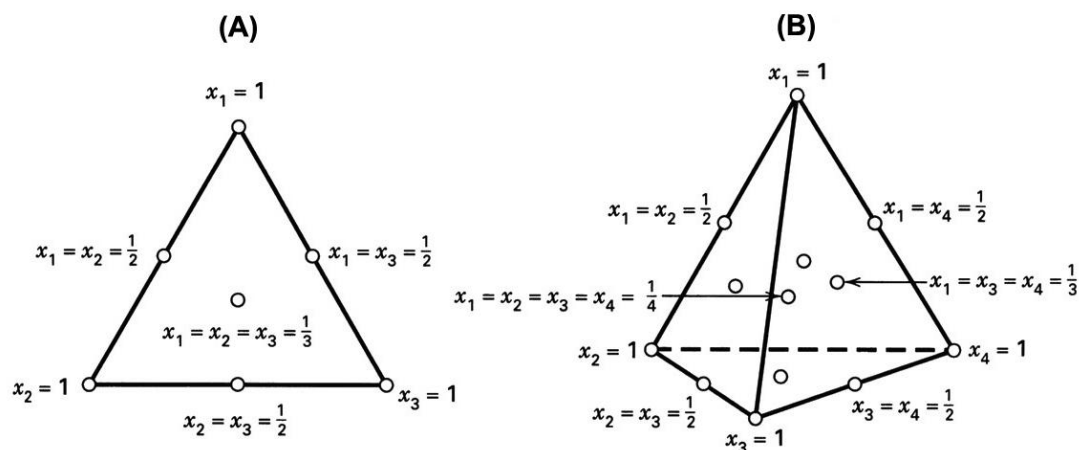


FIGURA 5 – PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS DO TIPO CENTRÓIDE SIMPLEX PARA TRÊS E QUATRO COMPONENTES

NOTA: (A) planejamento Centróide Simplex para três componentes; (B) planejamento centróide simplex para 4 componentes

FONTE: Retirado de CALADO, MONTGOMERY (2003)

O efeito causado pelo uso de um componente isolado e das interações entre os componentes da mistura (obtido com o modelo adotado) pode ser previsto através da análise dos coeficientes de cada um dos fatores da equação. Quando coeficientes da equação relativos à mistura de um ou mais componentes apresentam valores positivos, significa que a mistura apresenta um efeito sinérgico; quando estes coeficientes são negativos, a interação entre os componentes é antagônica (NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001).

As superfícies de resposta têm por objetivo representar, de forma gráfica e visual, as relações entre diversos fatores (variáveis) que sejam de interesse para a otimização de uma resposta. Assim, maximizar o rendimento de reações, avaliar pureza de procedimentos extrativos, aumentar sensibilidade de medições voltamétrica e otimizar extrações de metabólitos secundários em plantas são exemplos para aplicações de superfícies de resposta (SOARES; BRUNS; SCARMÍNIO, 2007). Após verificar o tipo de relação entre a resposta observada e as variáveis independentes (se linear, quadrática ou cúbica), é importante avaliar a significância estatística da falta de ajuste fornecida pela

superfície de resposta. Dependendo do critério estatístico adotado (95% de nível de confiança, por exemplo), a superfície de resposta pode ser adotada ou não.

2.3.2 A monografia da *M. sylvestris* na farmacopéia brasileira

Apesar de não estar descrita na farmacopéia brasileira 5ª edição, a *M. sylvestris* possui uma monografia na farmacopéia brasileira 4ª edição (BRASIL, 2000), onde constam informações relativas à descrição morfo-anatômica macro e microscópica (inclusive de pós), características organolépticas e ensaios de pureza, identificação e teor de mucilagem. Segundo esta monografia, somente as folhas (e não as flores) são consideradas como “droga vegetal”, e o método de identificação química desta espécie utiliza a técnica de cromatografia em camada delgada, cujo marcador na solução de referência é a malvidina-monoglicosídeo. Para a extração deste marcador, devem ser misturadas as folhas secas pulverizadas com uma solução de metanol-ácido clorídrico (25%) na proporção 9:1 (p/v), mantendo o sistema sob agitação por 15 minutos. Após o desenvolvimento do cromatograma, tanto a solução de referência quanto a solução de amostra devem revelar uma mancha principal com fator de retenção (R_f) de aproximadamente 0,40 (considerando um sistema cromatográfico de 10 cm); a solução amostra ainda deve revelar duas outras manchas secundárias com R_f de 0,45 e 0,75.

Dessa forma, a farmacopéia brasileira revogada reconhecia que, para a identificação por marcador fitoquímico, somente folhas de *M. sylvestris* deveriam ser submetidas a um processo extrativo cujo resultado era a observação de pelo menos uma mancha relativa a um flavonóide da família das antocianinas denominado malvidina-3-O-glucosídeo, conhecido como oenina (GASPARETTO *et al.*, 2012). Apesar de existirem outros sistemas de extração de antocianinas, tendo em vista que o ácido clorídrico é corrosivo e o metanol é tóxico (LOPES *et al.*, 2007), o método proposto pela farmacopéia é convencionalmente utilizado, inclusive em extrações em grande escala, principalmente quando estas substâncias são extraídas de uvas.

2.3.3 Malvidinas

As principais classes de pigmentos responsáveis pela coloração de flores, folhas e frutos são as porfirinas, os carotenóides e os flavonóides. As tonalidades de azul, violeta, vermelho e rosa são fornecidas principalmente pelos flavonóides, dentre os quais se destacam as antocianinas. Além de fornecer cor, as antocianinas estão intimamente relacionadas com a proteção contra agentes oxidantes nas plantas. Esses compostos são glicosídeos que por hidrólise ácida liberam agliconas denominadas antocianidinas, das quais seis se destacam na natureza (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) e cuja diferença reside no número de hidroxilas e no grau de metilação presentes no anel flavílico (LOPES *et al.*, 2007).

Quando em solução aquosa, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de quatro diferentes estruturas químicas em equilíbrio. As estruturas (Figura 6) são representadas pelo cátion flavílio (desenvolve a cor vermelha), pela base anidra quinoidal (desenvolve a cor azul), pela pseudo-base carbinol (incolor) e pela chalcona (que pode ser incolor ou desenvolver cor levemente amarelada). O predomínio de cada uma das formas depende essencialmente da temperatura, do pH do meio, da presença de luz, oxigênio e íons metálicos (LOPES *et al.*, 2007; LIU; FU; NIAN, 2014).

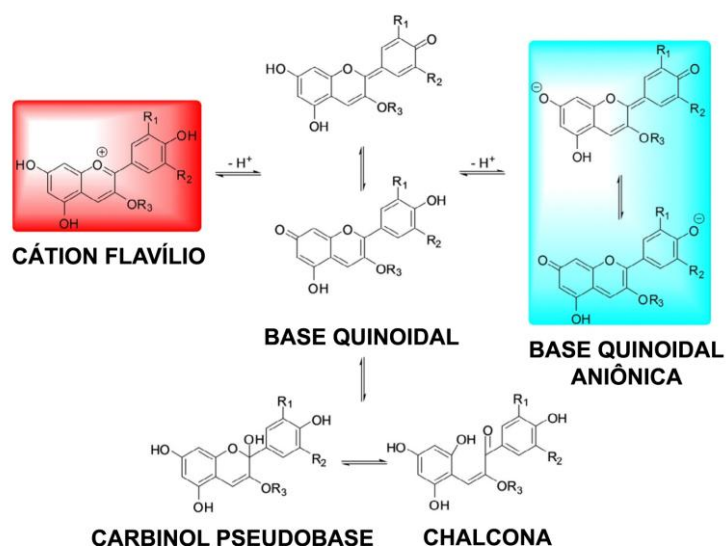


FIGURA 6 – TRANSFORMAÇÕES ESTRUTURAIS DAS ANTOCIANINAS EM DIFERENTES pH

FONTE: Retirado de LIU; FU; NIAN, (2014)

A pH abaixo de 2, as antocianinas apresentam-se basicamente na forma catiônica; com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal. Em meio aquoso a hidratação do cátion flavílio leva ao equilíbrio entre a forma carbitol e chalcona. À temperatura ambiente, e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento e leva horas para ser atingido. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da formação da base chalcona (HEREDIA *et al.*, 1998). Dessa forma, o sucesso da extração de uma antocianina específica de uma matriz vegetal depende do ajuste físico-químico das condições de extração.

De especial interesse terapêutico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, as antocianinas utilizam diversos mecanismos de ação cardioprotetivos, como a limitação do estresse oxidativo (através da diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio – ERO pela estimulação da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e mieloperoxidase); aumento da produção de NO, que liga-se diretamente em células endoteliais causando relaxamento de vasos sanguíneos; diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e aumento de citocinas anti-inflamatórias e (IL-10); diminuição da expressão de moléculas de adesão endotelial (ICAM-1), com conseqüente diminuição da migração de células imunes; manutenção da homeostasia lipídica, com reduções significativas dos níveis de colesterol e triglicérides (KRUGER *et al.*, 2014).

Na *M. sylvestris*, destacam-se as antocianinas derivadas da antocianidina malvidina (Figura 7), tais como a malvidina-3,6-diglucosídeo (malvina) e a malvidina-3-glucosídeo (oenina) (GASPARETTO *et al.*, 2012), esta última inclusive sendo considerada o marcador fitoquímico desta espécie, segundo a farmacopéia brasileira.

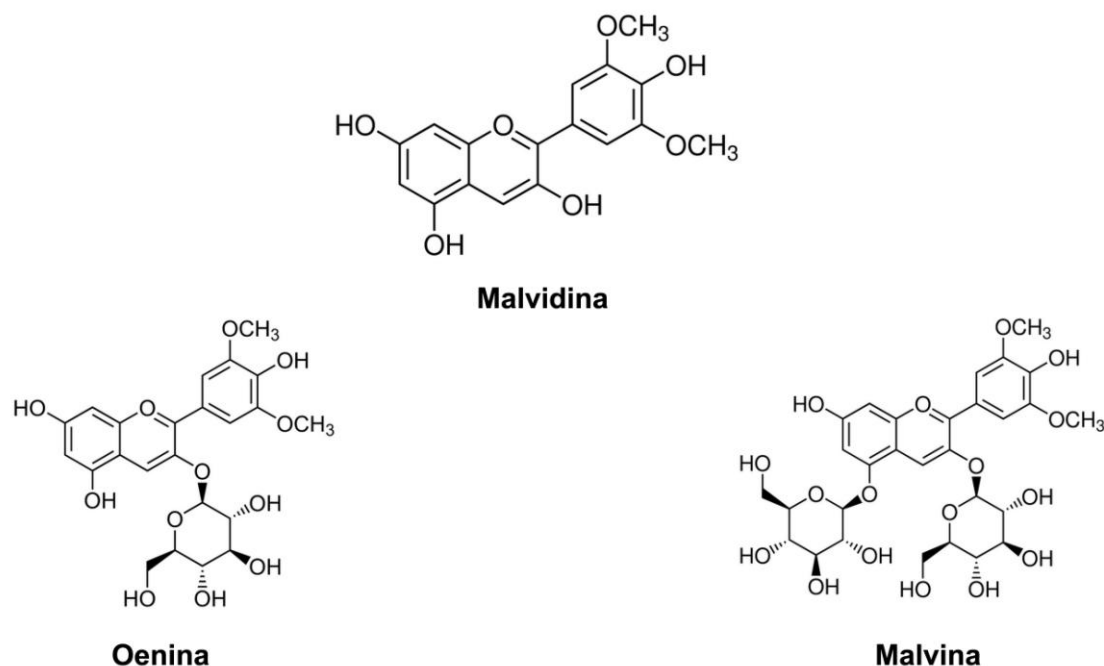


FIGURA 7 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE MALVIDINAS ENCONTRADAS EM PARTES AÉREAS DE *M. sylvestris*
 FONTE: Adaptado de ZHAO *et. al.*, (2013)

Malvidina é uma das antocianidinas mais amplamente distribuídas entre as espécies vegetais. Possui uma grande variedade de ações terapêuticas, incluindo atividade citotóxica contra células leucêmicas induzindo-as à apoptose (através da interferência na cascata EGRF-MAPK, a qual é crucial na regulação da proliferação celular e cascata do AMPc); atividade anti-hipertensiva através da inibição da enzima conversora de angiotensina (HUANG *et al.*, 2014); a neutralização do estresse oxidativo e peroxidação lipídica e inibição da angiogênese induzida por VEGF (QUINTIERI *et al.*; 2013); e inibição do desenvolvimento de processos inflamatórios por mecanismos envolvendo a supressão da produção de IL-6, da expressão de COX-2 e da biossíntese de iNOS/NO, provavelmente através da inibição da ativação do NF- κ B (PAIXÃO; DINIS; ALMEIDA, 2012).

Capítulo 1

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS “MALVAS”

A avaliação da atividade anti-inflamatória de plantas medicinais em geral inicia com investigações com base no conhecimento etnobotânico, por comunidades que as consomem e observam seus efeitos. Neste sentido, em diversas localidades do mundo, há registros do uso de *M. sylvestris* desde 3000 a.C. (HENRY; PIPERNO, 2008). Sua ação é principalmente relacionada contra afecções de boca e garganta, como nas dores de dente, inflamações de gengiva (PIERONI *et al.*, 2004), aftas (PASSALACQUA *et al.*, 2007), inflamações buco-faríngeas (NOVAIS *et al.*, 2004) e abscessos dentários (LOI *et al.*, 2004). Como a sua ação principal abrange o alívio das inflamações da mucosa oral, possui uso potencial na odontologia atuando contra a periodontite, uma doença de alta prevalência e que envolve a reabsorção de osso alveolar e perda do dente (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Contudo, apesar do uso disseminado desta planta, poucos estudos são encontrados na literatura abordando suas propriedades farmacológicas e mecanismos de ação (CONFORTI *et al.*, 2008; SLEIMAN, DAHER, 2009; ESTEVES *et al.*, 2009).

A *S. cordifolia* é uma planta tradicionalmente utilizada na medicina Ayurvédica indiana há centenas de anos, onde é conhecida como “Bala”. Acredita-se que o seu uso traga “força e beleza” (JAIN *et al.*, 2011). Em muitos lugares se utilizam as sementes e as raízes, mas é o consumo das folhas que proporciona os efeitos terapêuticos mais importantes, tais como atividade anti-inflamatória, analgésica, hipoglicemiante e hepatoprotetora (SINGH, 2006). Dentre as atividades anti-inflamatórias, destaca-se o uso como anti-reumática e contra os efeitos da asma. Investigações fitoquímicas mostraram a presença de diversas classes de compostos, como flavonóides, alcalóides, esteróides e aminoácidos (SUTRADHAR *et al.*, 2008). Porém se destaca a presença de teores próximos a 2% nas folhas de efedrina e pseudoefedrina, conhecidos estimulantes do SNC e que podem ajudar na perda de peso (JAIN *et al.*, 2011). Dentre os alcalóides, a vasicinona, a vasicina e o vasicinal também estão presentes.

O *P. graveolens* é uma planta muito conhecida e utilizada na África do Sul. Possui um odor característico, sendo utilizado na aromaterapia. Apesar do bem estabelecido efeito antimicrobiano do seu óleo essencial (no combate à acne e no tratamento de infecções fúngicas de pele), poucos trabalhos na literatura relatam a sua atividade anti-inflamatória (NAEINI *et al.* 2011; ROSATO *et al.*, 2007). Alguns autores estabelecem o seu uso como anti-inflamatório no tratamento da hemorróida e inflamações de pele (eczemas) (LALLI *et al.*, 2008). A composição química do óleo essencial também é bem estabelecida, tendo como principais componentes o citronelol, o geraniol, o linalool e o α -humuleno (RANA *et al.*, 2002).

O uso de células da linhagem RAW 264.7 pode ser uma forma de avaliar a potencial atividade anti-inflamatória de plantas *in-vitro* (NAHAR *et al.*, 2014; HEO *et al.*, 2012). Macrófagos são células fagocíticas que atuam ativamente durante a inflamação. Alguns fatores que ativam os macrófagos e iniciam as reações imunes e defesas inflamatórias incluem citocinas pró-inflamatórias (interferon-gama), e lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Durante o processo inflamatório, LPS induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente ativando enzimas como iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e COX (ciclooxigenase), que desencadeiam a produção dos mediadores inflamatórios óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, respectivamente (LEE *et al.*, 2012).

As prostaglandinas são os mediadores responsáveis pelo desenvolvimento de sinais da inflamação (como edema, dor, calor e rubor) e também pela mobilização dos sistemas de defesa celular e humoral do organismo, incluindo quimiotaxia de leucócitos, modulação da resposta imunológica e regulação da hiperalgesia (HARA *et al.*, 2010).

Para identificar e quantificar prostaglandinas em sobrenadantes de cultivo celular diversas metodologias já foram descritas por diferentes autores. Neste sentido, destaca-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), pela sua alta sensibilidade e seletividade (BLEWETT *et al.*, 2008).

Tendo em vista a falta de estudos acerca dos mecanismos de ação anti-inflamatórios da *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens*, o objetivo deste

capítulo foi desenvolver e validar método analítico por CLAE-EM/EM para quantificação de eicosanóides e valiar a atividade anti-inflamatória dos extratos brutos e frações das três espécies, utilizando cultivos de células RAW 264.7.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do material vegetal

As folhas e flores de *M. sylvestris* foram colhidas no município de Ponta Grossa-PR (25°05'01.24"S; 50°12'10.84" W). Folhas de *S. cordifolia* foram colhidas no município de Dourados-MS (22°12'04.12"S; 54°54'34.26"W). Folhas de *P. graveolens* foram colhidas no município de Curitiba-PR (25°18'45.87"S, 49°0'29.4804"W). As exsiccatas das espécies foram depositadas no Museu Botânico de Curitiba, sob os números MBM384458, MBM388190 e MBM381610, respectivamente.

Aproximadamente 2 kg de folhas secas de cada espécie e 200 g de flores de *M. sylvestris* foram submetidos à secagem em estufa com circulação de ar a 35°C. Em seguida, os materiais vegetais secos foram moídos em triturador de facas (IKA, modelo A-11) e a granulometria foi padronizada através de tamis de 1,19 mm de abertura. O pó obtido foi armazenado em frasco de vidro, em local seco, a 20°C e ao abrigo da luz.

3.2.2 Obtenção de extratos brutos e fracionados

Uma quantidade de um quilograma de material vegetal em pó de cada espécie foi, separadamente, misturada com 6000 mL de etanol absoluto (relação 1:6 p/v). O sistema foi mantido por sete dias a temperatura ambiente, em recipiente fechado e opaco, com agitação de 30 segundos, duas vezes ao dia. Decorrido o tempo necessário para o término do processo de extração, o líquido extrator foi separado do material vegetal através de sistema de filtração com papel filtro quantitativo de poro de 28 µm. O processo foi repetido três vezes.

O volume total de extrato alcoólico foi então submetido ao rotaevaporador sob pressão reduzida, controlando-se a temperatura de tal forma que não fosse superior a 60°C. Após a concentração dos extratos brutos, o material foi congelado (-80°C), e posteriormente liofilizado por 12 horas

(Virtis® Advantage Plus). Os rendimentos obtidos foram 14,7% (p/p) para *M. sylvestris*; 7,3% (p/p) para *S. cordifolia* e 8,3% (p/p) para *P. graveolens*.

Aproximadamente 50 g do extrato liofilizado bruto de cada espécie foram fracionados em funil de separação com o auxílio de 800 mL de solventes orgânicos, seguindo a ordem de polaridade hexano<clorofórmio<acetato de etila. Os rendimentos obtidos de cada extrato são mostrados na Tabela 2.

TABELA 2 – RENDIMENTO (% p/p) OBTIDO NO FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CADA ESPÉCIE

ESPÉCIE	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	FRAÇÃO REMANESCENTE
<i>M. sylvestris</i>	48,1	13,0	11,7	27,2
<i>S. cordifolia</i>	47,7	7,8	7,0	37,5
<i>P. graveolens</i>	40,2	11,5	13,4	34,9

FONTE: O autor, (2013)

3.2.3 Preparo das soluções de extrato

Soluções-mãe de todas as frações dos extratos das plantas estudadas foram preparadas dissolvendo o material liofilizado a uma concentração de 20 mg/mL, em etanol absoluto ou meio de cultivo celular (DMEM completo, com 1% de soro fetal bovino, antibióticos - 300 mg/mL de penicilina-G e 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina, isento de vermelho de fenol), dependendo da origem do extrato. Estas soluções foram sonicadas por 30 minutos (25°C) e então filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore®). Uma nova filtração, desta vez em ambiente estéril, foi realizada com filtros de 0,22 µm (Millipore®), para garantir a ausência de contaminantes de origem microbiana na solução.

Através de diluições das soluções-mãe, foram preparadas soluções de trabalho de extratos a 2.000, 1.000, 200 e 20 µg/mL (de acordo com a necessidade), utilizando como solvente o meio de cultivo celular. Todas as soluções foram acondicionadas em recipientes de polipropileno e congeladas a -40°C, até o momento da utilização.

3.2.4 Método de extração de eicosanóides do meio de cultivo celular

As amostras utilizadas no processo de validação do método analítico (item 3.2.6) e o sobrenadante do cultivo celular obtido após o tratamento das células RAW 264.7 (item 3.2.8), foram submetidos a um processo de extração líquido-líquido utilizando solvente orgânico para a quantificação dos eicosanóides (PGE_2 , PGD_2 , 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, TXB_2 e LTB_4). Em um tubo de polipropileno de 2 mL (Eppendorf[®], Alemanha), foi recolhida uma alíquota de 1 mL do meio de cultivo celular e em seguida foram adicionados 5 ng de padrão interno $\text{PGB}_2\text{-d}_4$ e 50 μL de ácido fórmico. Foi então adicionado 1 mL de acetato de etila, os tubos de polipropileno foram agitados cinco minutos em vórtex a 3200 rpm, seguido de cinco minutos de centrifugação a 14000 rpm a -10°C (Eppendorf[®], Centrifugue 5810R, Alemanha). Após a centrifugação, recolheu-se 700 μL do sobrenadante orgânico em novos tubos de polipropileno de 2 mL. Posteriormente, todo o volume de acetato de etila foi evaporado através de fluxo de nitrogênio. Em seguida, o resíduo foi reconstituído com 100 μL de fase móvel, agitado em vórtex durante 1 minuto e mantido em banho de ultra-som por 30 segundos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (-10°C) por cinco minutos, e então 70 μL do sobrenadante foram transferidos para insertos em *vials* âmbar para a injeção no CLAE-EM/EM.

3.2.5 Desenvolvimento de método de análise de eicosanóides por CLAE-EM/EM

3.2.5.1 Instrumentação

O cromatógrafo líquido utilizado nas análises foi um modelo Agilent[®] Technologies 1200 Series, com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna TCC SL G1316B. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da Applied Biosystems[®] modelo API 3200, utilizando fonte de ionização do tipo *Eletrospray* (ESI). O injetor automático e gerenciador de amostras utilizado foi o modelo CTC Waters[®] 2777 Sample Manager, e os dados obtidos pelo CLAE-EM/EM foram processados através do *software* Analyst[®], versão 1.4.2.

3.2.5.2 Preparo de padrões de PGE₂, PGD₂, 6-ceto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂, LTB₄ e PGB₂-d4

Foi adquirido um mix de padrões de prostanóides PGE₂, PGD₂, 6-ceto-PGF_{1α}, PGF_{2α} e TXB₂ de concentração 2000 µg/mL cada (Cayman[®] Chemical, lote 0446633); de leucotrieno LTB₄ de concentração 1000 µg/mL (Cayman[®] Chemical, lote 0439924-9) e de padrão interno PGB₂-d4 de concentração 500 µg/mL (Cayman[®] Chemical, lote 2745-5). Todos os padrões foram mantidos em suas embalagens de origem sob refrigeração a -80°C até o momento do uso.

Foram preparadas soluções-estoque diluídas em acetonitrila (Tedia[®] Brasil) misturando-se os eicosanóides de modo que a concentração de cada analito fosse de 1000 ng/mL. Estas soluções também foram armazenadas em refrigerador a -80°C. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo-se a solução-estoque em diluente adequado de acordo com a necessidade de cada experimento.

3.2.5.3 Infusão direta no Espectrômetro de Massas (EM)

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através da técnica da infusão direta (DIMS). Para isso, foi preparada uma solução contendo a mistura de todos os padrões na concentração de 250 ng/mL de cada, diluídos em acetonitrila/água (50:50 v/v). Esta concentração foi suficiente para obter-se uma intensidade de sinal com valores próximos entre 2×10^5 e 1×10^6 cps (contagens por segundo), preconizada pelo fabricante do equipamento como sendo suficiente para que seja possível a posterior otimização automática dos parâmetros de detecção.

Para este experimento, a posição do capilar vertical do ESI foi mantido em 10 mm e do horizontal em 5 mm. As amostras então foram infundidas no EM utilizando uma seringa (Hamilton[®], Reno, NV-USA), mantendo um fluxo de alimentação de 10 µL/min. O monitoramento de todos os padrões foi realizado no modo negativo, em função das suas características estruturais e de ionização.

3.2.5.4 Otimização automática do equipamento por *MRM*

Uma vez que a concentração utilizada para os padrões se adequou às características do equipamento, foi então realizada a otimização automática (*MRM*) dos parâmetros de DP (*potencial de desagregação*), EP (*potencial de entrada*), CEP (*potencial de entrada na célula de colisão*), CE (*energia de colisão*) e CXP (*potencial da célula de saída*) do analisador de massas do equipamento. Um ajuste fino de cada parâmetro foi realizado automaticamente para cada composto, e ao final deste procedimento foi obtido um relatório contendo todos os valores otimizados.

Após a otimização por *MRM*, foram obtidos os espectros dos compostos com os íons moleculares $[M-H]^+$ e seus fragmentos. Foram então escolhidos para o monitoramento no espectrômetro de massas os dois fragmentos mais intensos (estáveis) referentes a cada composto.

3.2.5.5 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Após o ajuste dos parâmetros do analisador de massas, foram então otimizados os parâmetros da fonte de ionização. Para isto foi realizada uma Análise por Injeção em Fluxo (FIA), que ajustou CUR (*gás de cortina*), CAD (*gás de colisão*), GS1 (*gás nebulizador*), GS2 (*gás secante*), IS (*voltagem do capilar*) e TEM (*temperatura da fonte*).

A injeção em fluxo foi realizada acoplando-se o cromatógrafo líquido, sem a coluna cromatográfica, ao espectrômetro de massas. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (50:50 v/v), com fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e volume de injeção de 10 μL . A posição vertical do capilar do *Eletrospray* foi ajustada para 3 mm, e a horizontal para 5 mm.

3.2.5.6 Análise por CLAE-EM/EM

O desenvolvimento do método cromatográfico foi inicialmente baseado em estudos prévios disponíveis na literatura (MASOODI; NICOLAOU, 2006, BLEWETT *et al.*, 2007). O método foi desenvolvido utilizando soluções

contendo todos os eicosanóides (PGE_2 , PGD_2 , 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, TXB_2 , LTB_4) e o padrão interno utilizado ($\text{PGB}_2\text{-d4}$), todos na concentração de 100 ng/mL, diluídos em fase móvel. Em função das características moleculares dos eicosanóides e da análise da literatura, optou-se pela utilização de coluna cromatográfica de sílica do tipo C18. A marca e o tipo da coluna escolhida para o desenvolvimento foi a Zorbax™ Eclipse® XDB-C18 de resolução rápida de 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro e 1,8 micron de tamanho de partícula (Agilent® Technologies, EUA). Ajustes no sistema cromatográfico como variações no fluxo (de 150 a 400 $\mu\text{L}/\text{min}$), composição (diferentes proporções de acetonitrila em água, variando de 30% a 75%) e modo de eluição da fase móvel (isocrática ou por gradiente) também foram avaliadas. Ácido fórmico (0,1% v/v) como aditivo de fase móvel sempre foi considerado, em função das características estruturais dos compostos analisados. Testes com relação ao volume de injeção (variando entre 10 e 20 μL) e temperatura do forno da coluna (variando entre 25°C e 40°C) também foram realizados.

Foram escolhidos os parâmetros que forneceram o melhor sistema cromatográfico, considerando o adequado perfil dos picos, a maior intensidade do sinal gerado e o menor tempo de corrida possível.

3.2.6 Validação do método

A validação do método de quantificação da PGE_2 , PGD_2 , 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e TXB_2 foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº 27, de 17 de maio de 2012. Para que um método seja considerado validado, os seguintes requisitos devem ser atendidos: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão, efeito residual, efeito matriz, recuperação e estabilidade dos analitos em matriz biológica e em solução (BRASIL, 2012).

Como matriz de validação, foi utilizado o sobrenadante do meio de cultivocelular (DMEM completo) obtido após 24 horas de incubação com células RAW 264.7, em ambiente a 37°C e com 5% de CO_2 . Esta matriz foi fortificada com concentração conhecida dos analitos e padrão interno, e então

submetida ao processo de extração, conforme item 3.2.4, e as amostras injetadas no CLAE-EM/EM. Para as análises estatísticas de todos os parâmetros de validação, o nível basal de todos os eicosanóides presentes originalmente na matriz foi descontado.

3.2.6.1 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram estimados através da relação sinal-ruído. Para condução deste estudo, soluções de trabalho a partir de uma solução mãe (contendo PGE₂, PGD₂, 6-ceto-PGF_{1α}, PGF_{2α} e TXB₂) de concentração 1000 ng/mL foram preparadas por meio de diluições sucessivas. 50 µL desta solução, 50 µL de uma solução a 200 ng/mL de padrão interno (PGB₂-D₄) e 50 µL de ácido fórmico foram adicionadas de 900 µL de matriz, extraídas (item 3.2.4) e analisadas até que fosse estimado através da relação sinal/ruído de 3:1 para o LD e pelo menos 10:1 para o LIQ, até que desejada precisão (coeficientes de variação inferiores a 15%) entre as réplicas fosse alcançada.

3.2.6.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada durante três dias distintos através do método da padronização interna. Para o preparo das curvas de calibração, alíquotas de 900 µL de matriz de validação foram fortificadas com 50 µL da solução contendo os analitos, 50 µL da solução do padrão interno e 50 µL de ácido fórmico. Após fortificação das amostras, os analitos foram extraídos conforme descrito no item 3.2.4, de modo a obter sete níveis de concentração em triplicata, onde a menor concentração da curva corresponde ao LIQ. Para todos os analitos, estas concentrações foram: 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 150 ng/mL e 200 ng/mL. A quantidade de padrão interno em cada nível foi mantida sempre em 5 ng.

Para os compostos uma curva de calibração foi gerada automaticamente pelo *software* Analyst[®] versão 1.4.2 a fim de confirmar a relação linear entre as áreas dos picos dos analitos/área do pico do padrão interno versus a

concentração dos analitos/concentração do padrão interno. O modelo matemático para gerar a curva foi o método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear $1/x$. O ângulo, o intercepto e o coeficiente de correlação (r^2) foram calculados como parâmetros da regressão. Além disso, para cada composto, em cada nível de concentração, foram calculados o coeficiente de variação (CV%) e o erro relativo (ER%) com a finalidade de monitorar os ajustes de precisão e exatidão dos dados. Para cada nível de concentração as variações de precisão e exatidão não devem exceder 15%, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20%. O coeficiente de correlação (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2012). Além disso, para cada nível da curva de calibração, a precisão e a exatidão também foram avaliadas. Os níveis relativos aos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), foram respectivamente 10,0, 100,0 e 150,0 ng/mL.

3.2.6.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada através do método de comparação com a matriz. Para a realização deste ensaio, alíquotas de 100 μ L de metanol e 50 μ L de ácido fórmico foram adicionadas a tubos de *Eppendorf* contendo, separadamente, seis amostras com 900 μ L de meio DMEM que passou 24 horas em contato com as células de cultivo. Estas amostras foram submetidas ao processo de extração descrito no item 3.2.4.

Em uma segunda etapa, duas alíquotas de 900 μ L de meio DMEM, que passou 24 horas em contato com as células de cultivo foram fortificadas com 50 μ L da solução dos analitos, 50 μ L da solução do padrão interno e 50 μ L de ácido fórmico de modo a obter a concentração referente ao LIQ. Estas amostras foram submetidas ao processo de extração descrito na Seção 3.2.4.

Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos de interesse foram sobrepostos aos cromatogramas obtidos com a matriz fortificada. As respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito obtido com a matriz fortificada. As respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012).

3.2.6.4 Amostras de controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade (CQ) do limite inferior de quantificação (LIQ), e as de baixa (CQB), média (CQM), alta concentração (CQA) e limite superior de quantificação (LSQ), foram preparadas de maneira similar às amostras da curva de calibração, porém em cinco repetições e utilizando as concentrações de 5 ng/mL (LIQ), 10 ng/mL (CQB), 100 ng/mL (CQM), 150 ng/mL (CQA), 200 ng/mL (LSQ) para todos os analitos.

O critério de aceitação das amostras de CQ é determinado pela obtenção de ao menos 66% dos controles com desvio inferior a 15% comparado ao valor nominal da curva de calibração, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20% (BRASIL, 2012).

A única amostra de CQ preparada de maneira distinta às amostras da curva de calibração foi a amostra de controle de qualidade de diluição (CQD). O preparo da CQD consistiu em adicionar de 900 µL de matriz com 50 µL dos analitos de modo a obter uma concentração final de 500 ng/mL de cada composto, seguido de agitação em vórtex por 3 minutos a 3200 rpm e centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm 0°C. Após esta etapa a amostra foi aliquotada para tubos de *Eppendorf* (3 de 190 µL) e adicionadas de 710 µL de matriz. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 5 minutos a 3200 rpm.

3.2.6.5 Efeito residual

O teste do efeito residual foi realizado para verificar um possível arraste dos analitos e PI gerados por análises anteriores. Para a condução do ensaio, foram realizadas injeções consecutivas de uma amostra de matriz isenta da adição de padrões, uma amostra de matriz fortificada com os analitos de interesse nos níveis mais altos de concentração da curva de calibração e duas amostras de matriz isenta de adição de padrões. As respostas dos picos interferentes, presentes nas duas amostras de matriz isenta de analitos injetadas após a amostra fortificada, devem ser inferiores a 20% comparado com as respostas dos analitos nas amostras processadas do LIQ. Para o

padrão interno (PI), as respostas obtidas com a matriz de validação devem ser inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012).

3.2.6.6 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas durante três dias consecutivos (intra e inter-dia) através da análise de oito réplicas de amostras controle (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD). A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as áreas obtidas de cada composto, em um mesmo nível de concentração. O cálculo do coeficiente de variação é apresentado na Equação 5. A exatidão foi estimada em cada nível de concentração através cálculo do erro relativo (ER%) obtido entre a concentração teórica e a concentração experimental de cada composto (Equação 6). Os erros de precisão e exatidão devem ser inferiores a 15%, exceto para o CQ-LIQ onde as variações não devem exceder 20% (BRASIL, 2012).

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{concentração média experimental}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$ER (\%) = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{nom}}}{C_{\text{nom}}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde C_{exp} é a média da concentração obtida experimentalmente e C_{nom} é a concentração nominal ou real.

3.2.6.7 Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz, seis alíquotas de 900 µL de matriz, foram fortificadas com 100 µL de metanol e 50 µL de ácido fórmico e submetidas ao processo de extração. O extraído foi ressuspensionado em 50 µL da solução do PI e 50 µL dos analitos de modo a obter os mesmos níveis de concentração das amostras CQB e CQA. Para cada nível de concentração foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN, Equação 7) das respostas obtidas com os analitos em matriz e em solução, preparada nos mesmos níveis de concentração. O

efeito da matriz não é significativo quando a variação (CV%) dos fatores de matrizes normalizados relativos a todas as concentrações de um mesmo analito for inferior a 15% (BRASIL, 2012).

$$FMN = \frac{\frac{\text{Área do analito em matriz}}{\text{Área do PI em matriz}}}{\frac{\text{Área do analito em solução}}{\text{Área do PI em solução}}} \quad (\text{Equação 7})$$

3.2.6.8 Testes de estabilidade em matriz

3.2.6.8.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em matriz sob as condições normais de trabalho do laboratório. Para a condução deste ensaio, alíquotas de 900 µL de matriz foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos, de modo a obter as mesmas concentrações do CQB e do CQA.

As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 5 minutos a 3200 rpm e em seguida mantidas em bancada por 4 e 6 horas. Após este período, as amostras receberam alíquotas de 50 µL da solução do padrão interno e 50 µL de ácido fórmico, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQA e do CQB. Após esta etapa as soluções obtidas passaram pelo processo de extração e foram injetados no CLAE-EM/EM.

Os resultados obtidos com as amostras armazenadas na bancada foram comparados com a média dos valores das amostras de matriz recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012). O ensaio foi conduzido utilizando seis repetições preparadas para cada nível de concentração.

3.2.6.8.2 Estabilidade de pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi realizada da mesma forma que a estabilidade de curta duração (item 3.2.6.8.1). No entanto, após o processamento, as amostras permaneceram no gerenciador de amostras do

CLAE-EM/EM por períodos de 3, 6 e 8 horas (3 °C). Decorrido esses períodos, as amostras foram analisadas. Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores das amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado empregando o ER%, o qual não deve exceder 15% (BRASIL, 2012).

3.2.6.8.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade dos analitos também foi determinada em matriz após 1, 2 e 3 ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando 36 alíquotas de 900 µL de meio de cultivo DMEM, fortificadas nos mesmos níveis de concentração do CQB (18 amostras) e do CQA (18 amostras). As amostras fortificadas foram congeladas por 24 h (-40 °C) e então descongeladas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz (1º ciclo).

Quando completamente descongeladas, um lote de amostras (6 CQB e 6 CQA) passou pelo processo de extração, para posteriormente ser injetado em CLAE-EM/EM. Os outros dois lotes foram novamente congelados (-40 °C) por mais um período de 24 h, e assim sucessivamente até completar 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Os resultados obtidos com as amostras do ciclo de congelamento e descongelamento foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

3.2.6.8.4 Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade de longa duração, 36 alíquotas de 900 µL de matriz foram fortificadas com solução dos analitos, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB (18 amostras) e do CQA (18 amostras). Após fortificação as amostras foram agitadas em vórtex por 5 minutos a 3200 rpm, e em seguida congeladas (-40 °C) por um período de 10 e 20 dias (período que excedeu o tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise

da última). Após cada período de tempo, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e extraídas.

Os resultados obtidos com as amostras armazenadas em freezer (10, 20 e 30 dias), foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras de matriz recém-preparadas. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

3.2.6.9 Teste de estabilidade em solução

3.2.6.9.1 Estabilidade da solução de trabalho em bancada

A estabilidade das soluções de trabalho em bancada foi realizada após 3 horas de armazenamento sobre a bancada (21°C, com incidência direta de luz artificial). Após este período, 50 µL da solução de padrão interno e 50 µL da solução dos analitos foram misturadas, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA. Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER%, o qual não deve exceder 10% (BRASIL, 2012).

3.2.7 Células da linhagem RAW 264.7

Células da linhagem RAW 264.7 (macrófagos derivados de monócitos de ratos leucêmicos), adquiridas da Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich– UFRJ, foram mantidas em meio DMEM completo alta glucose, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Himedia[®], Mumbai, Índia), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 300 mg/mL de penicilina-G e 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina. A incubação foi realizada a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, sendo as células sub-cultivadas a cada 3 dias, na concentração de 1,0x10⁵ células/mL.

Num experimento típico, as células foram plaqueadas na densidade de 5,0x10⁵ células/mL em meio DMEM completo alta glucose, com L-glutamina e

sem bicarbonato de sódio, isento de vermelho de fenol (Himedia[®], Mumbai, Índia) suplementado com 1% de SFB, em placas de 24 poços (TPP[®], Suíça). Antes da realização dos ensaios, as células permaneceram 24 horas nestas condições, para adequada ambientação. A quantidade de células plaqueada forneceu uma subconfluência média de 95%.

3.2.7.1 Avaliação da viabilidade e proliferação celular

A proliferação das células RAW 264.7 após 24 horas de tratamento foi observada em microscópio óptico (Olympus[®] CH30) após diluição com solução 0,4% Azul de Trypan em salina tamponada com fosfatos (PBS). Ao número de células totais (viáveis e mortas), contadas em câmaras de Neubauer Improved[®], atribui-se a atividade de proliferação celular, comparando-se o número de células obtidas em todos os tratamentos realizados com as células controle (aquelas que não receberam nenhum tipo de tratamento).

A viabilidade das células RAW 264.7 após 24 horas de tratamento (incubação em atmosfera úmida a 37°C, com 5% de CO₂) foi avaliada através do ensaio colorimétrico de citotoxicidade do MTT. As células, cultivadas a 5,0x10⁵ células/mL, foram tratadas com LPS (0,5 µg/mL), dexametasona (10 µM) e com os extratos brutos de folhas e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente de *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens*, nas concentrações de 1,0; 10,0; 50,0; 100,0 e 1000,0 µg/mL de cada fração. No caso da *M. sylvestris*, foi avaliada também a viabilidade de células tratadas com extrato bruto das flores, nas mesmas concentrações das folhas.

Adicionalmente, foi avaliada a viabilidade das células quando submetidas ao tratamento combinado com LPS (0,5 µg/mL) e os extratos brutos e fracionados das três espécies, na mesma faixa de concentração. Em cada poço de cultivo, foi adicionado uma alíquota de 100 µl de solução de MTT (2 mg/ml, em PBS), e estas permaneceram sob as condições de incubação por mais 4 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm, e os sobrenadantes foram coletados. Os cristais de formazam foram dissolvidos em 500 µL de DMSO e em seguida foi avaliada a absorvância

fornecida pela amostra, a 540 nm. A viabilidade então foi expressa em porcentagem de células viáveis em função da absorvância da amostra, comparada a amostras do grupo controle (células que não receberam tratamento), consideradas com 100% de viabilidade. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão do percentual de viabilidade celular.

Tanto para as análises de viabilidade quanto para as de proliferação celular, as diferenças entre o grupo controle (células que não receberam tratamento) e o grupo de células que recebeu algum tipo de tratamento foram avaliadas pelo teste de ANOVA *one-way* seguido pelo teste *t* para amostras independentes. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA)

3.2.8 Avaliação do efeito de extratos de *M. sylvestris* (folhas e flores), *S. cordifolia* e *P. graveolens* sobre a liberação de eicosanóides por células RAW 264.7

Células RAW 264.7 ($5,0 \times 10^5$ células/poço, subconfluência de 95%) foram submetidas a tratamento com extratos brutos e frações de *M. sylvestris* (folhas e flores), *S. cordifolia* e *P. graveolens*. Foram avaliadas duas concentrações de extratos para o tratamento com cada uma das espécies, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. Como inibidor da liberação de eicosanóides pelas células, foi utilizado o anti-inflamatório esteroide de referência dexametasona (10 μM por poço); como estimulante da liberação de eicosanóides pela células, foi utilizado LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$); células que não receberam nenhum tipo de tratamento foram denominadas controle. Utilizando as mesmas concentrações, as células foram simultaneamente tratadas com os extratos e o LPS e também com a dexametasona e o LPS.

Os cultivos permaneceram por 24 horas, a 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO_2 . Após este período, o sobrenadante desses cultivos foi coletado e submetido ao processo de extração (item 3.2.4). Em seguida, o doseamento de PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e TXB_2 foi realizado por CLAE-EM/EM,

utilizando a metodologia analítica validada (item 3.2.6). Cada experimento foi realizado em seis repetições independentes, e os resultados foram expressos em função da razão entre as concentrações de cada eicosanóide nos grupos tratados e no controle. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade de distribuição dos parâmetros investigados com todos os tratamentos. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos controle e os grupos que receberam tratamento com LPS ou dexametasona foram avaliados pelo teste de ANOVA *one-way*, seguido pelo teste *t* para amostras independentes. Adicionalmente, o teste de ANOVA *one-way* seguido do teste *t* para amostras independentes foi também aplicado para verificar diferenças entre o grupo que recebeu tratamento com LPS e os grupos que receberam tratamento com LPS e algum tipo de extrato, nas concentrações utilizadas (10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$). Para todos os casos, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA)

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE-EM/EM para quantificação de eicosanóides

Para o desenvolvimento do método bioanalítico por CLAE-EM/EM, o primeiro passo foi a escolha da fonte de ionização. Optou-se pela fonte do tipo *Electrospray* (ESI) a qual permite ionizar compostos de média a alta polaridade, e é uma forma de ionização considerada “branda”, muito útil em análises de compostos lábeis.

Em seguida, foi avaliada a intensidade de sinal dos analitos. A Figura 8 mostra, no modo negativo de ionização, os íons moleculares $[M - H]^-$ dos compostos PGE₂ (351,1 *m/z*), PGD₂ (351,1 *m/z*), PGF_{2α} (353,1 *m/z*), 6-ceto-PGF_{1α} (369,0 *m/z*), TXB₂ (369,0 *m/z*), LTB₄ (335,2 *m/z*) e PGB₂-d4 (337,1 *m/z*). Para a avaliação dos íons moleculares, soluções de trabalho contendo 250 ng/mL de cada composto foram preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico e injetadas diretamente no espectrômetro de massas.

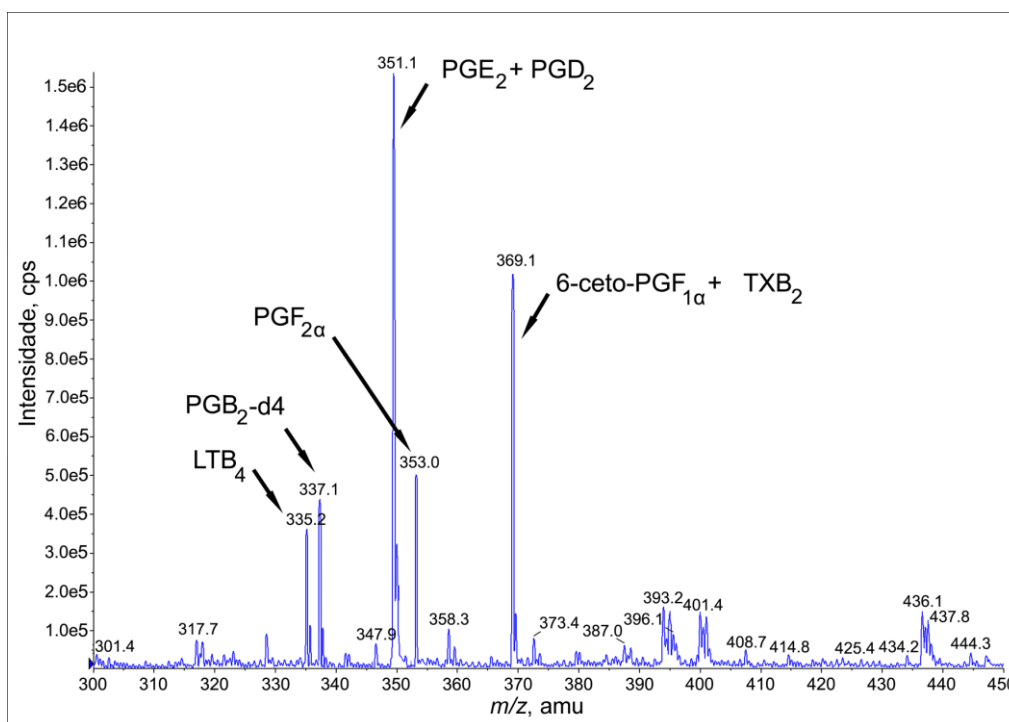


FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DOS ÍONS MOLECULARES DOS PADRÕES DE PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, 6-ceto-PGF_{1α}, TXB₂, LTB₄ E PGB₂-d4, UTILIZANDO IONIZAÇÃO NO MODO NEGATIVO

FONTE: O Autor, (2013)

Após a identificação do sinal de cada composto, foram ajustadas as concentrações das soluções a fim de garantir uma intensidade de sinal adequada entre $2,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ cps, intensidade esta recomendada pelo fabricante do equipamento para otimização automática dos parâmetros individuais de voltagem dos compostos via *Monitoramento de Reações Múltiplas* (MRM). Os parâmetros de voltagem ajustados foram o potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na célula de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP). Ao término da otimização automática dos parâmetros, ficou definido que o modo negativo de ionização foi o mais eficiente para ionizar os compostos de interesse. Isso se deve ao fato de que todos os compostos em estudo serem hidroxilados o que favorece a desprotonação. Foram obtidos os dois fragmentos de íons mais intensos de cada composto, sendo o fragmento mais intenso utilizado para quantificação e o segundo fragmento mais intenso para a qualificação do sinal analítico de cada substância. Assim, foram considerados os seguintes fragmentos de íons, em ordem decrescente de intensidade: PGE₂ (271,2 *m/z* e 315,3 *m/z*), PGD₂ (271,2 *m/z* e 315,3 *m/z*), PGF_{2α} (193,0 *m/z* e 309,0 *m/z*), 6-ceto-PGF_{1α} (163,2 *m/z* e 83,0 *m/z*), TXB₂ (169,1 *m/z* e 195,2 *m/z*), LTB₄ (195,0 *m/z* e 59,0 *m/z*) e PGB₂-d4 (113,1 *m/z* e 179,0 *m/z*). A Tabela 3 mostra os parâmetros de voltagem ajustados.

TABELA 3 – PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE PGE₂ E PGB₂-d4

COMPOSTO (ÍON MOLECULAR, <i>m/z</i>)	FRAGMENTOS DE ÍONS (<i>m/z</i>)	VOLTAGEM (V)				
		DP ¹	EP ²	CEP ³	CE ⁴	CXP ⁵
PGE ₂ e PGD ₂ (351,1)	271,2	-25	-5	-20	-22	-20
	315,3	-25	-5	-20	-14	-22
PGF _{2α} (353,1)	193,0	-50	-4,5	-20	-30	-4
	309,0	-50	-4,5	-20	-25	-4
6-ceto-PGF _{1α} (369,0)	163,2	-40	-4,5	-20	-34	0
	83,0	-40	-4,5	-20	-30	0
TXB ₂ (369,0)	169,1	-35	-5	-20	-24	-2
	195,2	-35	-5	-20	-18	-14
LTB ₄ (335,1)	195,0	-35	-5	-18	-20	0
	59,0	-35	-5	-18	-40	0
PGB ₂ -d4 (337,1)	113,1	-45	-4,5	-20	-34	0
	179,0	-45	-4,5	-20	-30	0

FONTE: O Autor, (2013)

NOTA: ⁽¹⁾Potencial de desagregação

⁽²⁾Potencial de entrada

⁽³⁾Potencial de entrada na célula de colisão

⁽⁴⁾Energia de colisão

⁽⁵⁾Potencial de saída da célula de colisão

A próxima etapa da otimização do espectrômetro de massas foi o ajuste dos parâmetros da fonte de ionização. Esse ajuste foi realizado por meio de análises por injeção em fluxo (FIA), acoplando o CLAE ao espectrômetro de massas, sem o uso de coluna cromatográfica. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (50:50 v/v), com fluxo de 200 µL/min e volume de injeção de 10 µL. A posição vertical do capilar do *Eletrospray* foi ajustada para 3 mm, e a horizontal para 5 mm. Os parâmetros otimizados nessa etapa foram: gás de interface (CUR): 10 psi; gás de colisão (CAD): 10 psi; gás de nebulização (GS1): 50 psi; gás auxiliar (GS2): 40 psi; voltagem do capilar (IS): -4500 V e temperatura da fonte: 450°C.

Ao término das otimizações do espectrômetro de massas, foram realizados os ajustes cromatográficos, objetivando um método rápido, com o menor uso de solvente orgânico possível e que proporcionasse a maior resolução possível entre os picos que utilizam as mesmas transições. As primeiras injeções foram realizadas utilizando uma coluna Zorbax SB C18 (2,1 x 150 mm; 1,8 µm) e fase móvel composta de diferentes proporções de água e acetonitrila, utilizando como aditivo 0,1% de ácido fórmico com fluxo de 300 µL/min. Apesar de ser um método que separava corretamente todos os analitos envolvidos, utilizava uma coluna indicada para uso em cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE). Desta forma, dado que esta coluna funciona adequadamente com pressões maiores do que o equipamento utilizado proporciona (devido, por exemplo, ao uso de conectores e tubulações de polieterecetona), os fluxos de fase móvel eram muito baixos (máximo de 300 µL/min) e como consequência os picos se mostraram largos e com tempos de corrida relativamente altos (doze minutos).

Com o objetivo de diminuir o tempo de corrida aliado ao uso de colunas adequadas, foram testadas diversas colunas de mesma fase estacionária, mas com diferentes diâmetros, larguras e tamanhos de partícula. A coluna inicial utilizada para o desenvolvimento do método foi uma XBridge C18 Waters®

Corporation (2,1 x 100 mm; 5 µm). Optou-se por realizar a corrida no modo gradiente com temperatura de 40°C, que foi de 95% de acetonitrila e 5% de água, a 95% de água e 5% de acetonitrila em 5 minutos de corrida, utilizando sempre como aditivo 0,1% de ácido fórmico. Nestas condições foi verificado que o tempo de corrida se estendeu exageradamente, sendo que os picos não foram observados em um tempo de 20 minutos. Pequenos ajustes no gradiente da eluição da fase móvel (utilizando os mesmos solventes) foram realizados, porém nem os tempos de retenção e nem a resolução se mostraram satisfatórios. Foi então utilizada a coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 50 mm; 1,8 µm) e, após a realização de diversos testes cromatográficos, variando-se principalmente o gradiente de eluição de fase móvel, foi definido que a proporção inicial ideal era a de 55% de água e 45% de acetonitrila. Esta composição proporcionou uma adequada separação entre a PGE₂ e seu principal isômero, a PGD₂, a qual utiliza as mesmas transições de monitoramento, com um tempo inferior a 5 minutos de corrida. A composição completa do gradiente de eluição é mostrada na Tabela 4.

TABELA 4 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE EICOSANÓIDES

TEMPO (min)	FLUXO (µL/min)	SOLVENTES	
		Água 0,1% AFO (%)	Acetonitrila 0,1% AFO (%)
0,00	700	55	45
0,50	700	55	45
1,57	700	25	75
1,58	700	55	45
4,00	700	55	45

FONTE: O autor, (2014)

Os demais parâmetros cromatográficos foram fluxo de fase móvel ajustado em 700 µL/min, volume de injeção de 5 µL, temperatura do forno da coluna de 40°C e um tempo de corrida de 4 minutos. Após estas definições, o cromatograma representativo dos compostos analisados, cada um na concentração de 100 ng/mL dissolvidos num solvente composto por 55% de água e 45% de acetonitrila, é mostrado na Figura 9.

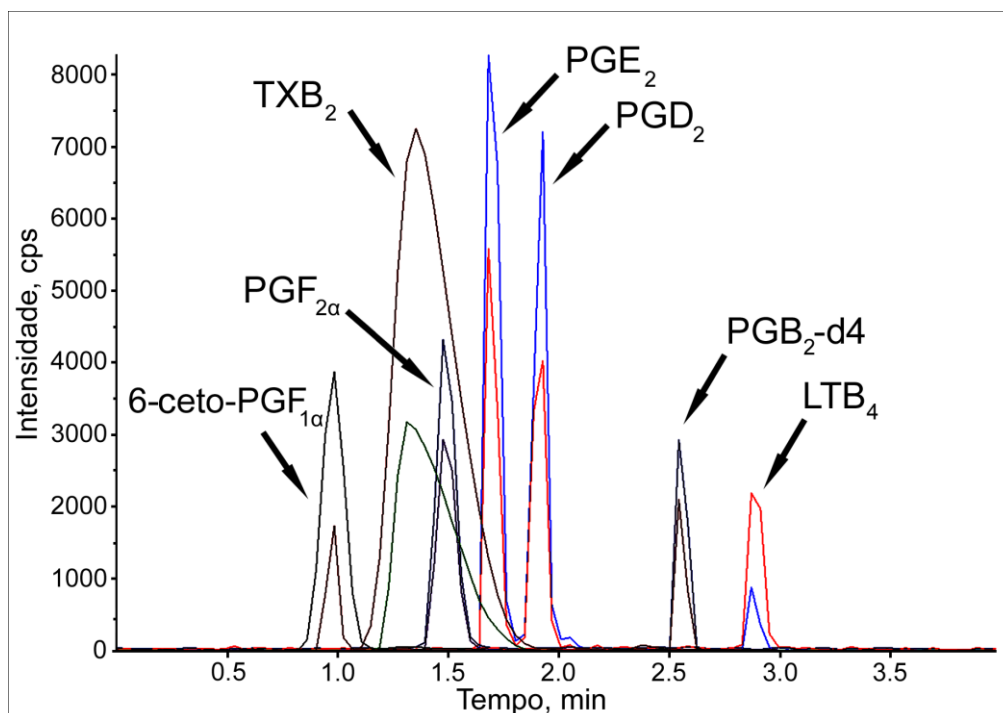


FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DA PGE_2 (Tr: 1,62 min), PGD_2 (Tr: 1,89 min), $PGF_{2\alpha}$ (Tr: 1,49 min), 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$ (Tr: 1,02 min), TXB_2 (Tr: 1,43 min), LTB_4 (Tr: 2,82 min) E DA PGB_2 -d4 (Tr: 2,59 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO ENTRE ÁGUA E ACETONITRILA, AMBOS CONTENDO 0,1% DE AFO.

DADOS: Coluna Zorbax Eclipse™ XDB-C18 (1,8 μ m, 4,6x50 mm, Agilent®)

FONTE: O Autor, (2013)

Um dos aspectos mais importantes na avaliação do método desenvolvido foi a qualidade cromatográfica no que tange ao perfil dos picos (as suas simetrias e larguras) e a resolução dos picos dos isômeros PGE_2 e PGD_2 , que utilizam as mesmas transições de monitoramento. Utilizando a Equação 8 para cálculo de resolução entre picos mostrada abaixo (onde t_1 e W_1 representam respectivamente o tempo de retenção e a largura do pico da PGE_2 e t_2 e W_2 representam respectivamente o tempo de retenção e a largura do pico da PGD_2), foi obtido o valor de resolução de 1,44, que foi considerado satisfatório.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1} \quad (\text{Equação 8})$$

A grande vantagem apresentada pelo método desenvolvido neste trabalho é que ele apresenta uma adequada separação entre a PGE_2 e o seu

principal isóbaro com um tempo de corrida relativamente baixo (4 min), utilizando uma coluna com diâmetro de 4,6 mm, adequada para o cromatógrafo utilizado. Outros autores também obtiveram uma adequada separação utilizando colunas de mesmo diâmetro, porém com partículas de tamanho 3 μm , 4 μm ou 5 μm , o que torna os picos mais alargados (SCHMIDT; COSTE; GEISLINGER, 2005, HISHINUMA *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2008) e/ou com corridas demasiadamente longas (NITHIPATIKOM *et al.*, 2002; ARAÚJO; FROYLAND, 2006).

O método desenvolvido apresenta um excelente perfil de todos os picos cromatográficos, e o tempo de corrida curto aliado ao baixo consumo de solvente orgânico torna a análise mais econômica e ambientalmente sustentável. Em virtude dos bons resultados obtidos com este método, a próxima etapa foi validá-lo.

3.3.2 Validação do método analítico

A validação do método analítico seguiu as diretrizes propostas pela resolução ANVISA RDC n. 27, de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Os parâmetros avaliados foram seletividade, limites de detecção e quantificação, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade dos analitos em matriz biológica e em solução. Do item 1.3.2.1 ao item 1.3.2.9 são mostrados os resultados da validação considerando os analitos PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ e TXB_2 . O LTB_4 não foi considerado na validação em função dos valores obtidos na linearidade e na estabilidade extrapolarem as variações máximas ou mínimas permitidas. Dessa forma, nas condições estabelecidas neste estudo, o LTB_4 pode ser avaliado apenas de forma qualitativa.

3.3.2.1 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram avaliados a partir da relação sinal/ruído, obtida diretamente dos cromatogramas (mínimo de 3 e 10 vezes para LD e LQ, respectivamente). As soluções com concentração conhecida de todos os analitos foram sucessivamente diluídas e injetadas até obtenção dos menores

picos detectáveis e quantificáveis. O método mostrou-se sensível, com valores de LD de 1 ng/mL (relações sinal/ruído superiores a 3,5) e LQ de 5 ng/mL (relações sinal/ruído superiores a 9,1) para todos os analitos.

3.3.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração, contemplando a faixa de 5,0 a 200 ng/mL. A análise de regressão mostrou que as curvas analíticas para todos os compostos analisados foram lineares com valor do coeficiente de correlação (r) superior ao estabelecido pela RDC N° 27/2012 da ANVISA, que preconiza valores iguais ou superiores a 0,98. Além disso, a precisão e a exatidão obtidas em cada nível de concentração foram consideradas adequadas. Como mostra a Tabela 5, os dois parâmetros apresentaram coeficientes de variação (CV%) ou erros relativos (ER%) inferiores a 11% (a RDC N° 27/2012 preconiza valores inferiores a 20% para o LIQ e 15% para os demais níveis da curva). Dessa forma, considerando a faixa de concentração estabelecida (5-200 ng/mL) o método desenvolvido garante uma resposta linear precisa e exata para os analitos PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, 6-ceto-PGF_{1α} e TXB₂.

TABELA 5 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO, EM FUNÇÃO DOS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS, OBTIDOS PARA PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, 6-ceto-PGF_{1α} E TXB₂

CONCENTRAÇÃO NOMINAL (ng/mL)	COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO DETERMINADA (ng/mL)	DESVIO PADRÃO	PRECISÃO (CV%)	EXATIDÃO (ER%)
5	PGE ₂	4,74	0,37	7,87	-5,03
	PGD ₂	4,89	0,09	1,96	-2,06
	PGF _{2α}	4,75	0,41	8,77	-4,83
	6-ceto-PGF _{1α}	5,17	0,07	1,53	3,42
	TXB ₂	4,53	0,30	6,63	-9,22
10	PGE ₂	9,79	0,54	5,60	-2,03
	PGD ₂	10,60	0,62	5,85	6,03
	PGF _{2α}	11,03	0,28	2,60	10,40
	6-ceto-PGF _{1α}	10,56	1,15	10,93	5,68
	TXB ₂	9,73	0,32	3,38	-2,63
20	PGE ₂	21,14	0,69	3,28	5,73
	PGD ₂	21,94	0,36	1,64	9,71
	PGF _{2α}	18,99	1,02	5,40	-5,04
	6-ceto-PGF _{1α}	19,72	0,29	1,49	-1,36
	TXB ₂	21,78	0,74	3,42	8,94
50	PGE ₂	51,27	3,78	7,38	2,56
	PGD ₂	45,07	1,69	3,77	-9,86
	PGF _{2α}	53,21	0,23	0,44	6,43
	6-ceto-PGF _{1α}	45,62	3,56	7,82	-8,74
	TXB ₂	53,58	0,85	1,60	7,18
100	PGE ₂	101,53	4,49	4,42	1,53
	PGD ₂	97,15	3,77	3,88	-2,85
	PGF _{2α}	98,93	6,03	6,09	-1,06
	6-ceto-PGF _{1α}	98,48	6,67	6,77	-1,52
	TXB ₂	103,72	2,90	2,79	3,72
150	PGE ₂	140,02	3,20	2,28	-6,65
	PGD ₂	143,44	1,84	1,28	-4,37
	PGF _{2α}	149,77	8,43	5,62	-0,15
	6-ceto-PGF _{1α}	154,75	0,63	0,41	3,17
	TXB ₂	145,49	7,02	4,83	-3,00
200	PGE ₂	206,39	10,79	5,23	3,20
	PGD ₂	215,52	7,20	3,34	7,76
	PGF _{2α}	199,43	8,76	4,39	-0,28
	6-ceto-PGF _{1α}	201,56	1,45	0,72	0,78
	TXB ₂	194,69	10,13	5,20	-2,65

FONTE: O autor, (2014)

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo

As curvas analíticas, as equações da reta e os valores de coeficiente de correlação para cada analito são mostrados na Figura 10.

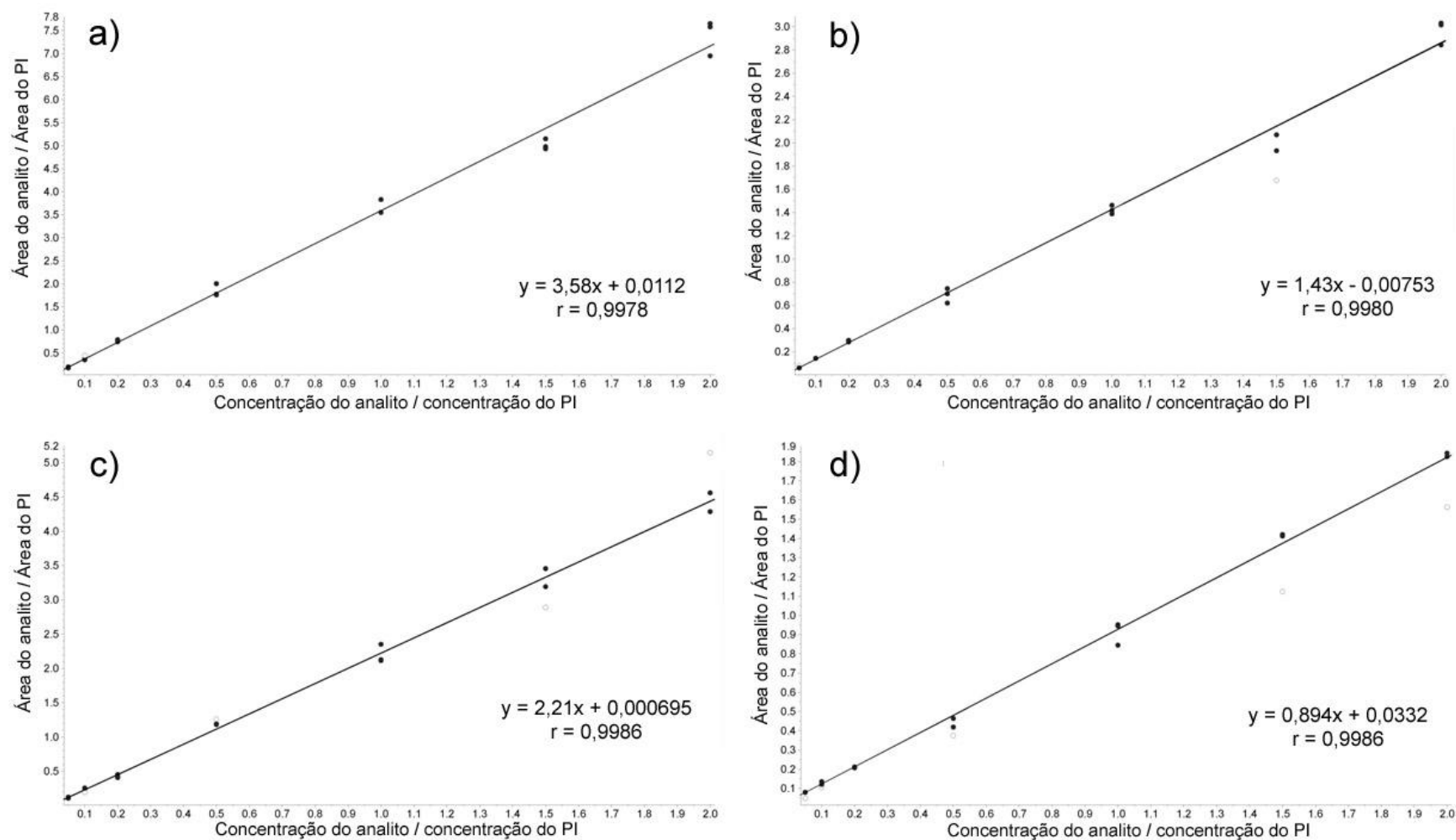
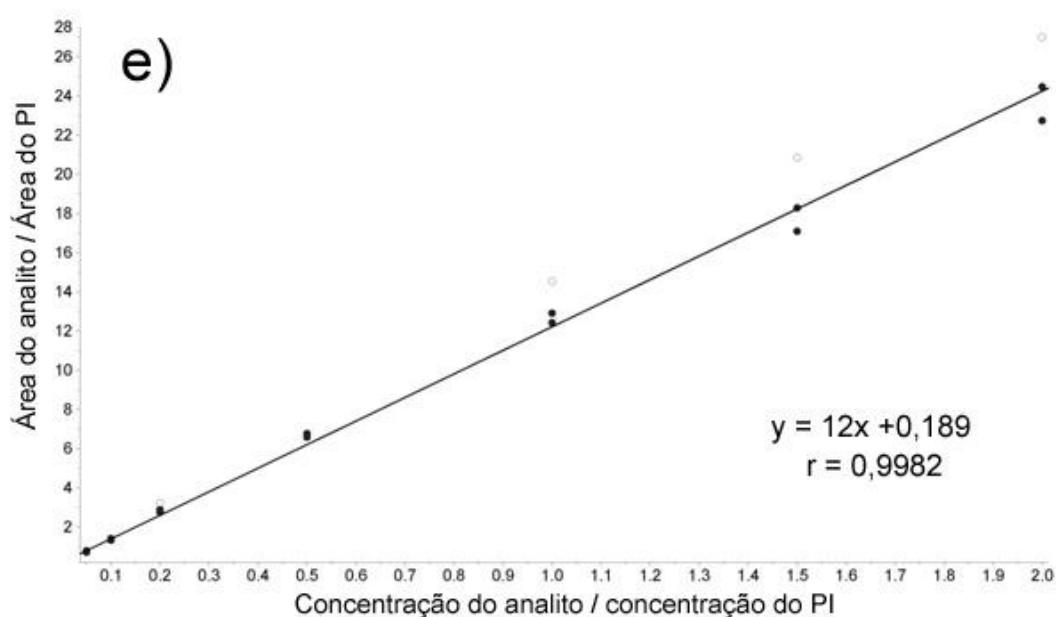


FIGURA 10 – CURVAS ANALÍTICAS COM AS RESPECTIVAS EQUAÇÕES DA RETA E VALORES DE COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS POR REGRESSÃO LINEAR 1/x DA PGE₂ (a), PGD₂ (b), PGF_{2α} (c), 6-CETO-PGF_{1α} (d) E TXB₂ (e).



(Continuação) FIGURA 10 - CURVAS ANALÍTICAS COM AS RESPECTIVAS EQUAÇÕES DA RETA E VALORES DE COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS POR REGRESSÃO LINEAR $1/x$ DA PGE_2 (a), PGD_2 (b), $PGF_{2\alpha}$ (c), 6-CETO- $PGF_{1\alpha}$ (d) E TXB_2 (e).

3.3.2.3 Seletividade

O ensaio de seletividade foi realizado através do método da comparação com a matriz, onde esta é avaliada quanto à presença de interferentes significativos. Como mostra a Figura 11, na matriz biológica não ocorre a presença de interferentes significativos nos mesmos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno, quando a matriz é fortificada na concentração equivalente ao LIQ. Desse modo, o método se mostrou seletivo para análise de PGE_2 , PGD_2 , 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, TXB_2 e PGB_2 -d4 extraídos de matriz composta por meio de cultivo celular, oferecendo confiabilidade sobre a identidade dos compostos monitorados.

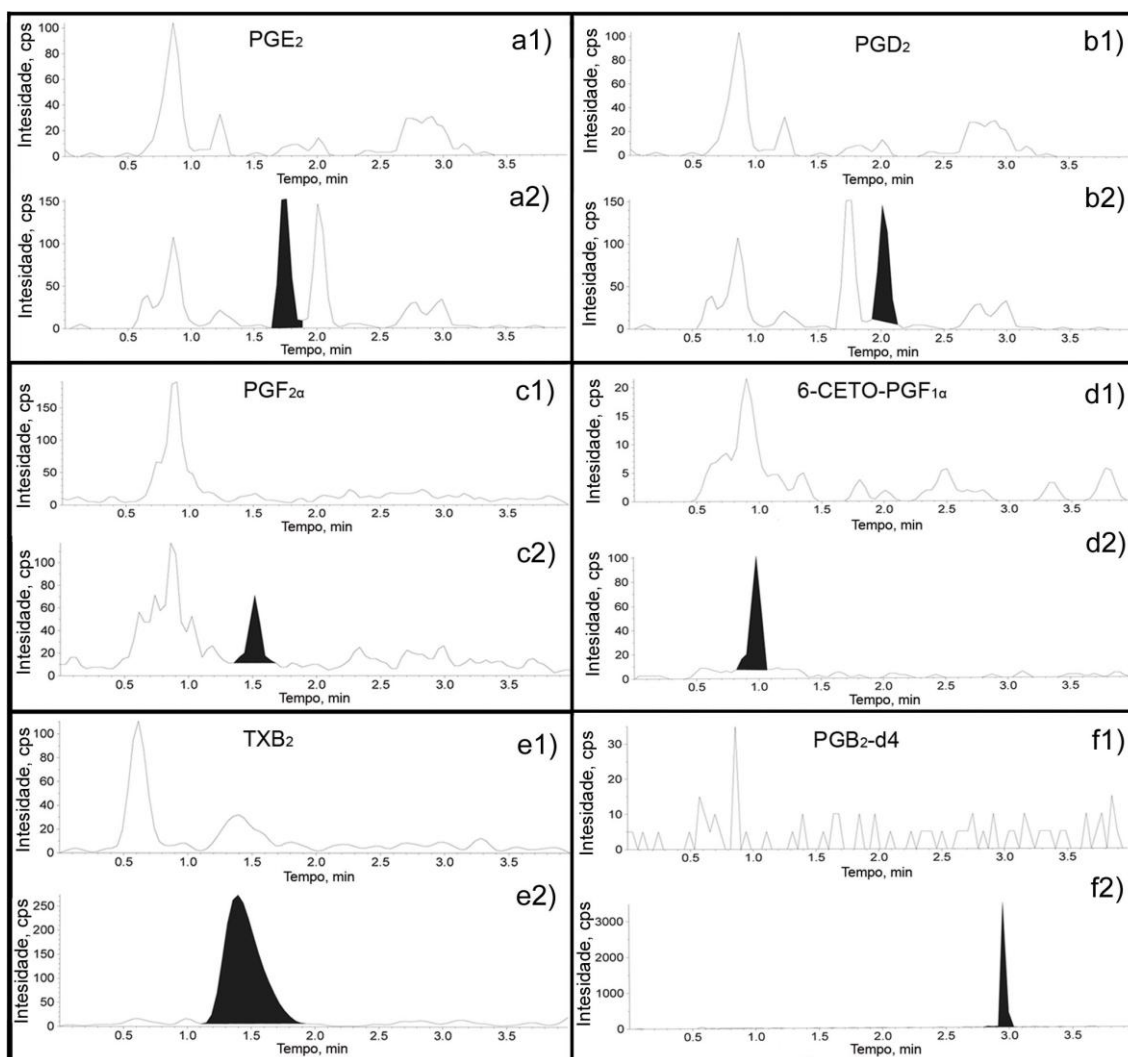


FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO E DE AMOSTRAS FORTIFICADAS NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ PARA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE.

NOTA: a1, b1, c1, d1, e1 e f1 representam as transições monitoradas para os analitos em matriz de validação. a2, b2, c2, d2, e2 e f2 representam as transições monitoradas para os analitos em matriz de validação fortificada com concentração equivalente ao LIQ

3.3.2.4 Efeito residual

Os cromatogramas obtidos com a injeção de matriz de validação, após a injeção de amostras preparadas no nível mais alto de concentração da curva de calibração (LSQ), estão apresentados na Figura 12 para PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ e na Figura 13 para TXB_2 e $\text{PGB}_2\text{-d}_4$. Nenhum pico interferente significativo foi observado no mesmo tempo de retenção dos analitos e do padrão interno, não havendo, portanto, risco de contaminação causada pelo arraste dos analitos entre as injeções.

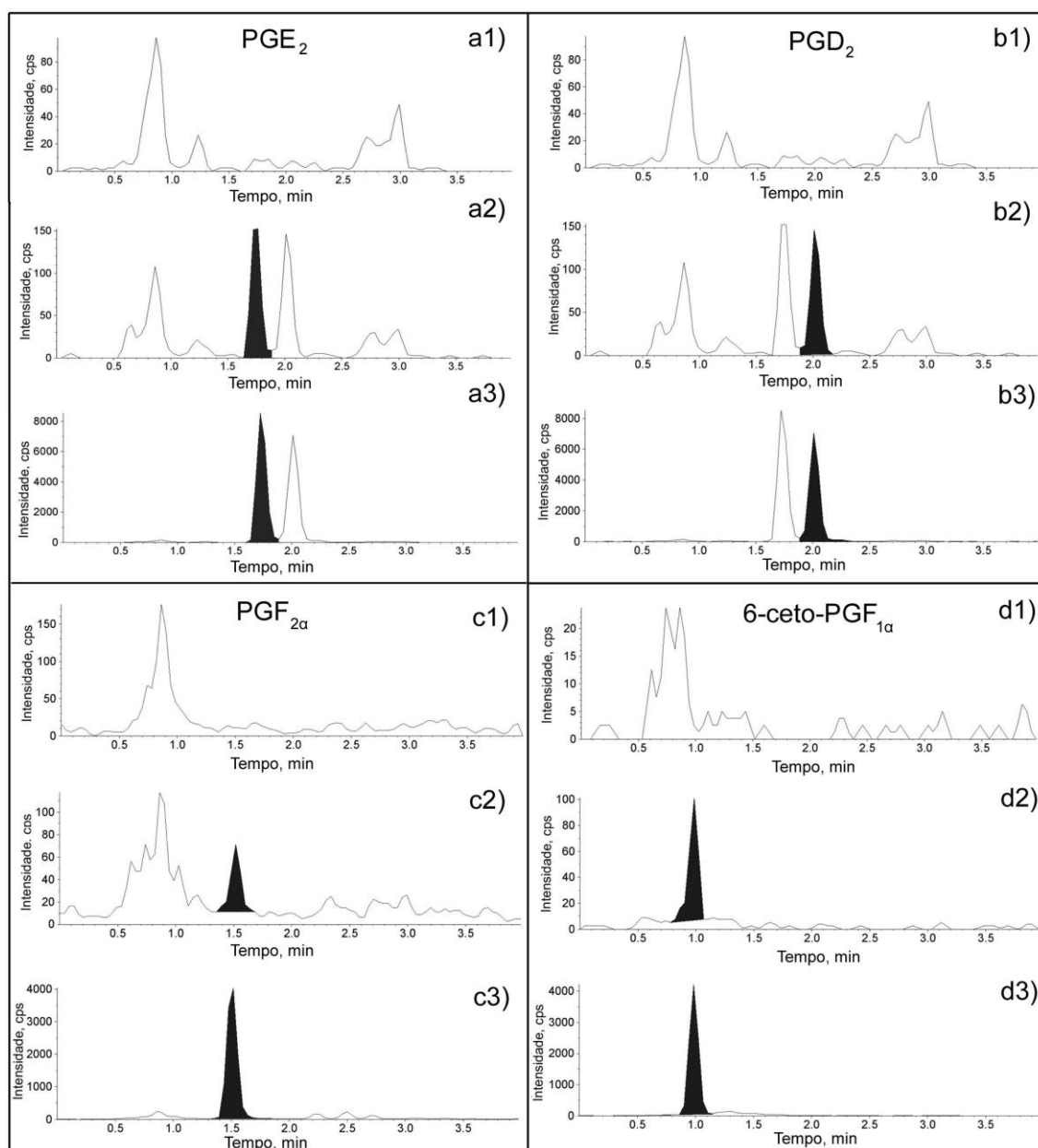


FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO E DE AMOSTRAS FORTIFICADAS NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ E LSQ PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL PARA PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} e 6-ceto-PGF_{1α}.

NOTA: a1, b1, c1 e d1, transições monitoradas para os analitos em matriz de validação, a2, b2, c2 e d2, transições monitoradas para os aqnalitos em matriz de validação fortificada em concentração equivalente ao LIQ, a3, b3, c3 e d3 transições monitoradas para os analitos em matriz de validação fortificada em concentração equivalente ao LSQ

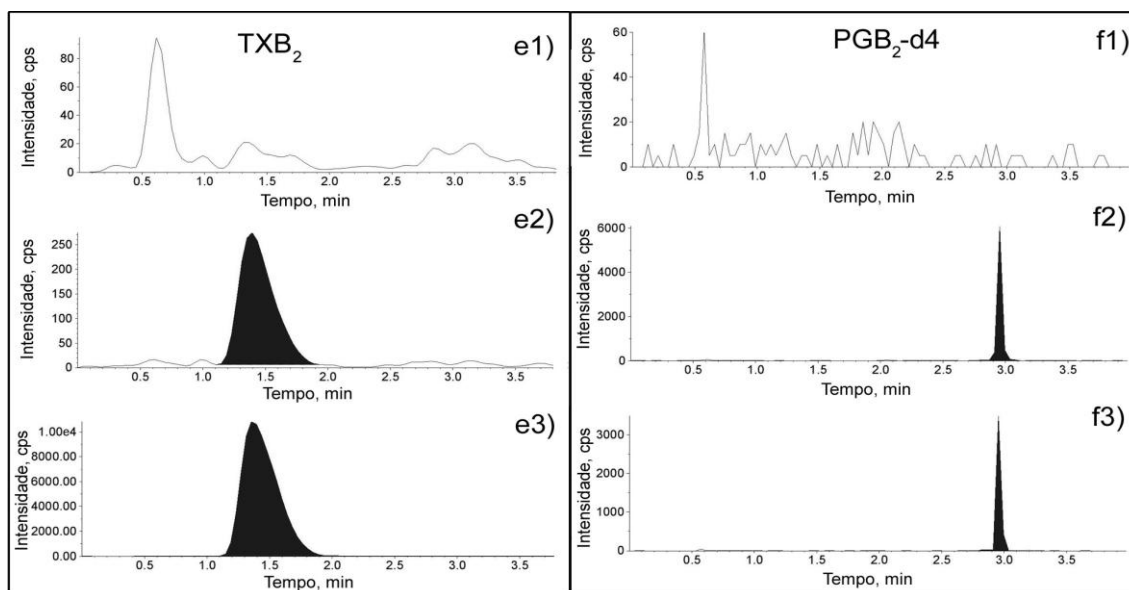


FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO E DE AMOSTRAS FORTIFICADAS NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ E LSQ PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL PARA TXB₂ e PGB₂-d4

NOTA: e1 e f1, transições monitoradas para os analitos em matriz de validação, e2 e f2, transições monitoradas para os aqnalitos em matriz de validação fortificada em concentração equivalente ao LIQ, e3 f3, transições monitoradas para os analitos em matriz de validação fortificada em concentração equivalente ao LSQ

3.3.2.5 Precisão e exatidão

Os resultados da precisão e exatidão encontram-se na Tabela 6. Conforme pode ser observado, para todas as amostras de controle de qualidade os coeficientes de variação (CV%) e erros relativos (ER%) foram menores que os 15% preconizados pela ANVISA (BRASIL, 2012). Portanto, este método foi considerado preciso e exato.

TABELA 6 - VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO E DE ERRO RELATIVO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO

ANALITOS	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO NOMINAL (ng/mL)	PRECISÃO		EXATIDÃO	
			Média Intra-dia (CV%)	Média Inter-dia (CV%)	Média Intra-dia (ER%)	Média Inter-dia (ER%)
PGE ₂	CQ-LIQ	5	6,79	5,23	-2,45	2,11
	CQB	10	12,37	8,33	-1,40	2,48
	CQM	100	8,22	6,73	-0,68	-2,58
	CQA	150	11,70	6,92	-3,35	-1,47
	CQD	100*	7,79	5,66	-2,52	-6,02
PGD ₂	CQ-LIQ	5	8,80	6,65	-3,05	0,83
	CQB	10	6,72	4,08	3,16	3,54
	CQM	100	3,69	5,43	2,14	1,42
	CQA	150	6,07	6,65	2,60	0,69
	CQD	100*	3,68	4,24	2,92	-4,00
TXB ₂	CQ-LIQ	5	11,23	6,87	-4,48	2,28
	CQB	10	6,00	4,50	-3,33	2,68
	CQM	100	3,27	5,33	6,00	0,48
	CQA	150	5,31	5,84	2,53	0,82
	CQD	100*	10,71	6,60	-1,90	-6,79
PGF _{2α}	CQ-LIQ	5	10,43	7,65	-4,10	-1,91
	CQB	10	7,89	6,80	-1,34	1,66
	CQM	100	6,20	6,05	6,33	0,94
	CQA	150	11,79	8,87	-0,42	-5,16
	CQD	100*	2,49	5,13	8,40	5,27
6-CETO-PGF ₁	CQ-LIQ	5	7,23	6,38	4,22	3,12
	CQB	10	4,89	4,02	6,80	2,20
	CQM	100	4,90	4,58	7,00	1,75
	CQA	150	6,56	6,28	0,72	-3,37
	CQD	100*	5,48	5,63	4,14	-2,43

NOTA: CQ-LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração; ER%: erro relativo; CV%: coeficiente de variação; *Valor nominal após diluição de 500 ng/mL para 100 ng/mL.

3.3.2.6 Efeito matriz

Os resultados do teste de efeito matriz são mostrados na Tabela 7. Verifica-se que o valor do coeficiente de variação do fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) de todos os analitos encontra-se abaixo de 8%, valor menor que os 15% máximos permitidos pela ANVISA. Esses resultados mostram que o efeito da matriz biológica nas respostas do analito e do padrão interno não é significativo.

TABELA 7 – FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO E VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE CADA ANALITO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

ANALITOS	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	FMN*	MÉDIA DOS FMNs \pm dp	CV% (FMN)
PGE ₂	10	1,25 \pm 0,07	1,22 \pm 0,05	3,74
	150	1,19 \pm 0,03		
PGD ₂	10	1,10 \pm 0,10	1,16 \pm 0,09	7,49
	150	1,23 \pm 0,04		
TXB ₂	10	1,15 \pm 0,03	1,16 \pm 0,01	0,61
	150	1,16 \pm 0,06		
PGF _{2α}	10	1,11 \pm 0,07	1,14 \pm 0,05	4,76
	150	1,18 \pm 0,05		
6-CETO-PGF _{1α}	10	1,09 \pm 0,12	1,08 \pm 0,02	1,70
	150	1,06 \pm 0,07		

NOTA: *FMN, Fator de matriz normalizado por padrão interno calculado de acordo com a Equação 7

3.3.2.7 Estabilidade

Os resultados da estabilidade dos analitos e do padrão interno em solução e em matriz de validação encontram-se na Tabela 8. As soluções, preparadas nas concentrações de 10 ng/mL e 150 ng/mL e diluídas em solvente composto por fase móvel, permaneceram estáveis por 3 h em condições de bancada (21°C, com incidência direta de luz artificial). Ensaios de longa duração de soluções, que demandam o uso de congelador para manutenção de soluções por mais de 24 h, não foram realizados, pois as soluções utilizadas eram sempre preparadas para uso imediato, e portanto apenas necessárias no momento da fortificação da matriz de validação (atividade realizada dentro do período de 3 horas). Além disso, ensaios que envolvem o congelamento foram realizados para a matriz de validação, pois esta condição era apenas necessária após a fortificação da mesma.

Os analitos também foram estáveis quando foram misturados com a matriz de validação, por um período de 3 h na bancada (21°C, com incidência direta de luz artificial) e 10 h após extração e manutenção no gerenciador de amostras do CLAE-EM/EM (3°C). O estudo de estabilidade de longa duração mostrou que as substâncias armazenadas em freezer (-40 °C) não sofrem degradação significativa em 20 dias e não houve comprometimento da estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento (24 h cada ciclo).

TABELA 8 - ESTABILIDADE DA PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, 6-ceto-PGF_{1α}, TXB₂ E PGB₂-d4 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

TIPO	CONDIÇÃO DE ARMAZENAMENTO	PARÂMETROS AVALIADOS	PGE ₂		PGD ₂		PGF _{2α}		6-ceto-PGF _{1α}		TXB ₂		PGB ₂ -d4
			10 ng/mL	150 ng/mL	10 ng/mL	150 ng/mL	10 ng/mL	150 ng/mL	10 ng/mL	150 ng/mL	10 ng/mL	150 ng/mL	150 ng/mL
SOLUÇÃO	Curta duração 3h bancada (21°C)	Recuperação (ng/mL ± dp)	9,4±0,5	142,1±9,6	10,1±0,8	141,5±9,6	10,5±1,1	159,6±11,5	9,8±1,3	150,7±2,7	9,6±0,4	138±2,3	141,3±4,9
		CV (%)	4,98	6,74	7,86	6,77	10,13	7,19	13,56	1,76	3,70	1,64	3,46
		ER (%)	-6,00	-5,25	1,07	-5,70	5,46	6,41	-2,00	0,48	-4,43	-7,77	-5,81
	Curta duração 3h bancada (21°C)	Recuperação (ng/mL ± dp)	9,5±1,3	138,2±11,8	9,0±0,9	141,3±12,4	9,0±0,9	129,7±7,6	11,1±0,9	155,0±4,0	10,1±0,6	148,7±6,8	136,4±11,5
		CV (%)	13,37	8,55	9,65	8,75	10,10	5,84	8,10	2,56	6,39	4,60	8,42
		ER (%)	-4,94	-7,84	-10,09	-5,80	-9,77	-13,52	10,65	3,33	1,26	-0,84	-9,04
MATRIZ	Pós-Processamento (10h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	9,2±1,3	142,5±8,2	9,3±1,0	129,6±11,1	10,1±0,6	152,5±8,9	9,5±1,0	145,6±2,2	8,6±0,4	131,0±8,1	128,9±8,3
		CV (%)	14,38	5,73	10,31	8,55	6,14	5,81	10,00	1,52	4,96	6,18	6,41
		ER (%)	-8,01	-4,99	-7,27	-13,61	1,21	1,64	-4,69	-2,93	-14,25	-12,66	-14,04
	3 ciclos de congelamento e descongelamento (24h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	9,1±0,5	137,9±14,9	10,1±0,7	145,6±8,6	10,6±1,2	158,3±12,2	10,1±1,1	145,7±10,0	10,3±0,7	150,5±4,2	NA
		CV (%)	5,29	10,78	6,83	5,91	11,11	7,71	11,01	6,83	6,94	2,81	NA
		ER (%)	-8,61	-8,09	1,11	-2,92	5,85	5,56	0,93	-2,85	3,46	0,31	NA
	Longa duração 20 dias (-40°C)	Recuperação (ng/mL ± dp)	10,0±1,3	152,3±4,9	9,4±0,7	143,1±6,0	10,0±0,8	148,8±7,5	10,3±0,9	158,8±6,6	10,1±0,6	148,5±2,6	NA
		CV (%)	12,54	3,25	7,95	4,18	8,12	5,05	8,61	4,16	6,04	1,73	NA
		ER (%)	-0,05	1,53	-9,34	-4,57	-0,44	-0,82	3,08	5,86	1,13	-0,99	NA

3.3.3 Células da linhagem RAW 264.7

A Figura 14 (A e B) mostra o aspecto fenotípico das células da linhagem RAW 264.7 utilizadas nos experimentos.

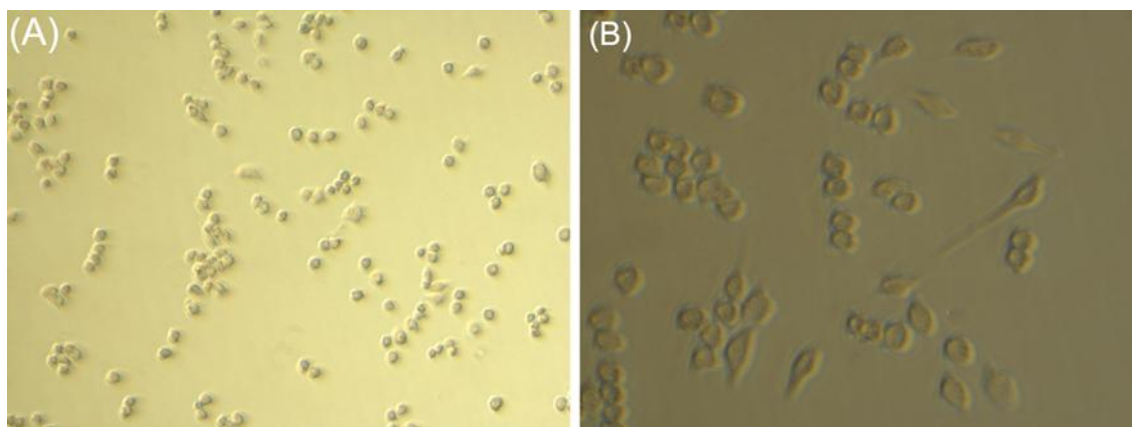


FIGURA 14 – IMAGENS DE CÉLULAS RAW 264.7 SOB AUMENTO DE 200x (A) E 400x (B)
FONTE: O Autor, (2013)

Quando cultivadas somente em meio suplementado com soro fetal bovino e antibióticos, as células RAW 264.7 proliferam abundantemente. Sob estas condições, a observação com o uso microscopia de luz invertida revela que praticamente a totalidade destas células adere-se à base do frasco, mostrando projeções citoplasmáticas e vacúolos proeminentes.

3.3.3.1 Avaliação da proliferação e da viabilidade celular

A avaliação da proliferação celular foi realizada pelo teste do azul de Trypan 0,4%, onde as células viáveis permanecem incolores e as células mortas, cuja parede é permeável ao corante, se tingem de azul (MALTA *et al.*, 2006). Neste ensaio, as células totais foram contadas em câmaras de Neubauer, avaliando-se o efeito de todos os tratamentos sobre a contagem das células, comparando-se com as células controle. No teste de viabilidade celular, realizado pelo método do MTT, foi medida a absorvância (a 540 nm) fornecida pelas amostras que receberam algum tratamento, comparando-se com os valores de absorvância obtidos em amostras controle. Foram avaliadas as influências do LPS (0,5 µg/mL), da dexametasona (10 µmol) e

dos extratos brutos e fracionados de *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens* (de 1,0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ cada) e destes mesmos extratos associados ao LPS sobre o comportamento da linhagem celular RAW 264.7. Os resultados estão apresentados nas Figuras 15, 16, 17 e 18 (respectivamente para os tratamentos com LPS e dexametasona, *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens*), em gráficos do tipo dose-resposta, onde as barras representam a média \pm desvio padrão do número de células contadas em cada amostra no teste de proliferação, enquanto a curva representa a viabilidade celular média \pm desvio padrão, expressa em porcentagem.

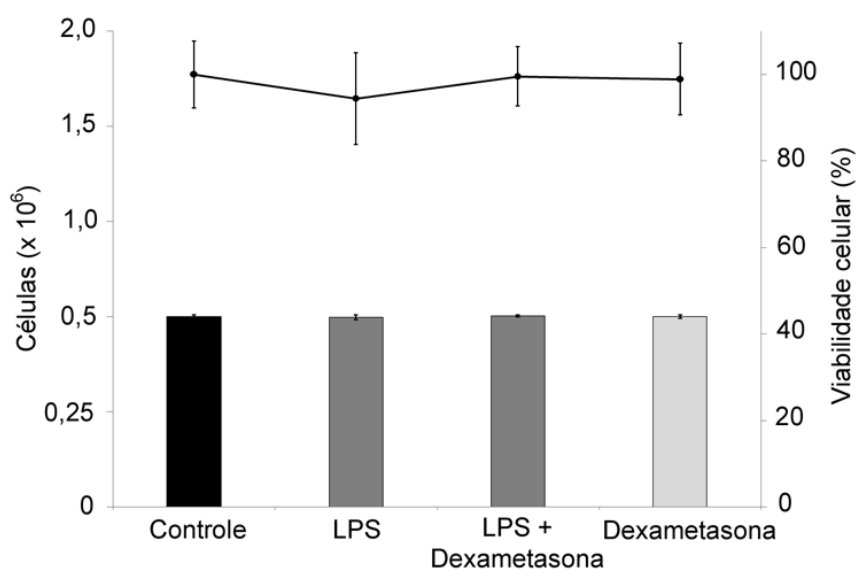


FIGURA 15 - EFEITO DO LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$), DA ASSOCIAÇÃO ENTRE LPS E DEXAMETASONA E DA DEXAMETASONA (10 μmol) SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: * $p \leq 0,05$, em relação ao grupo controle

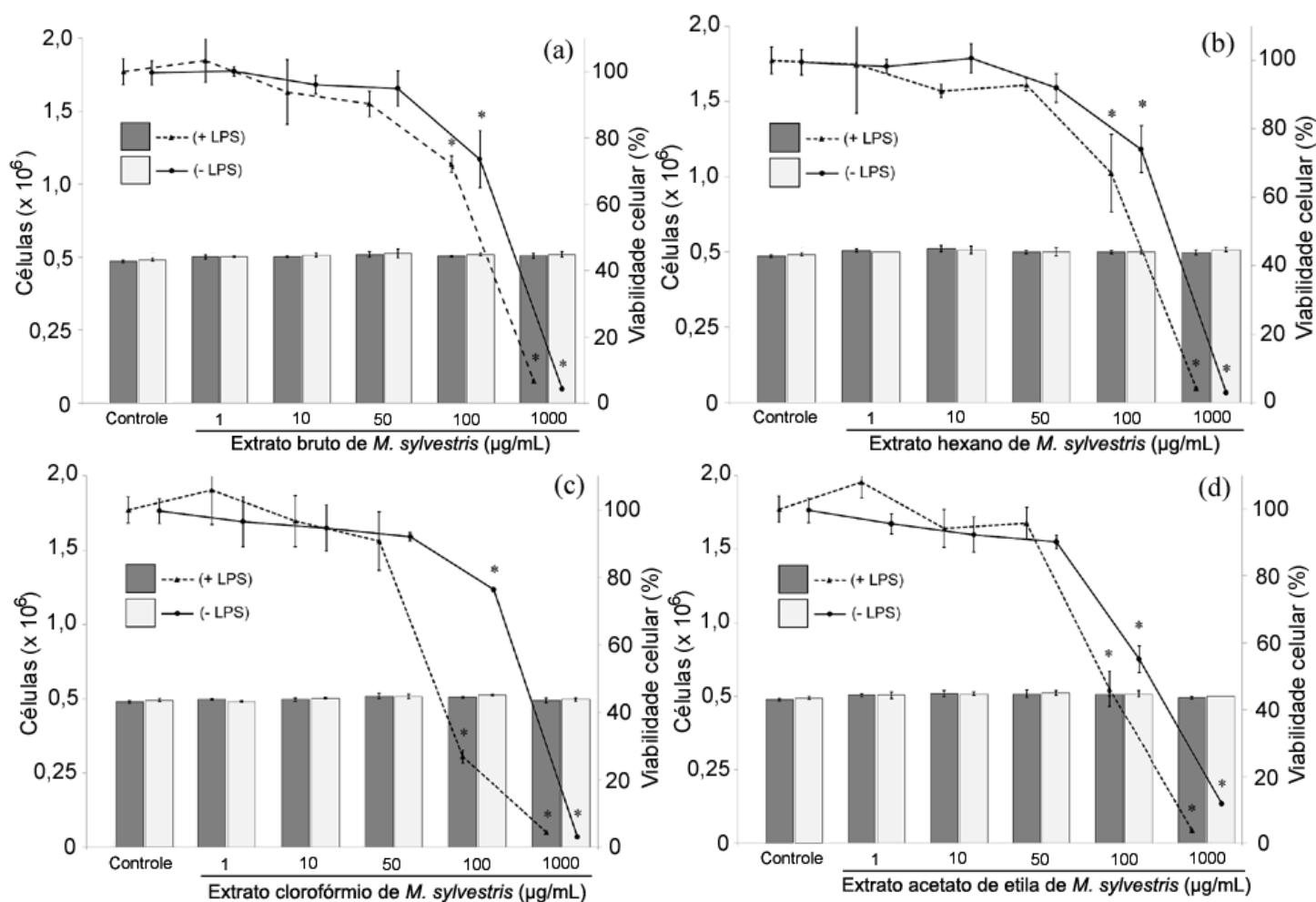
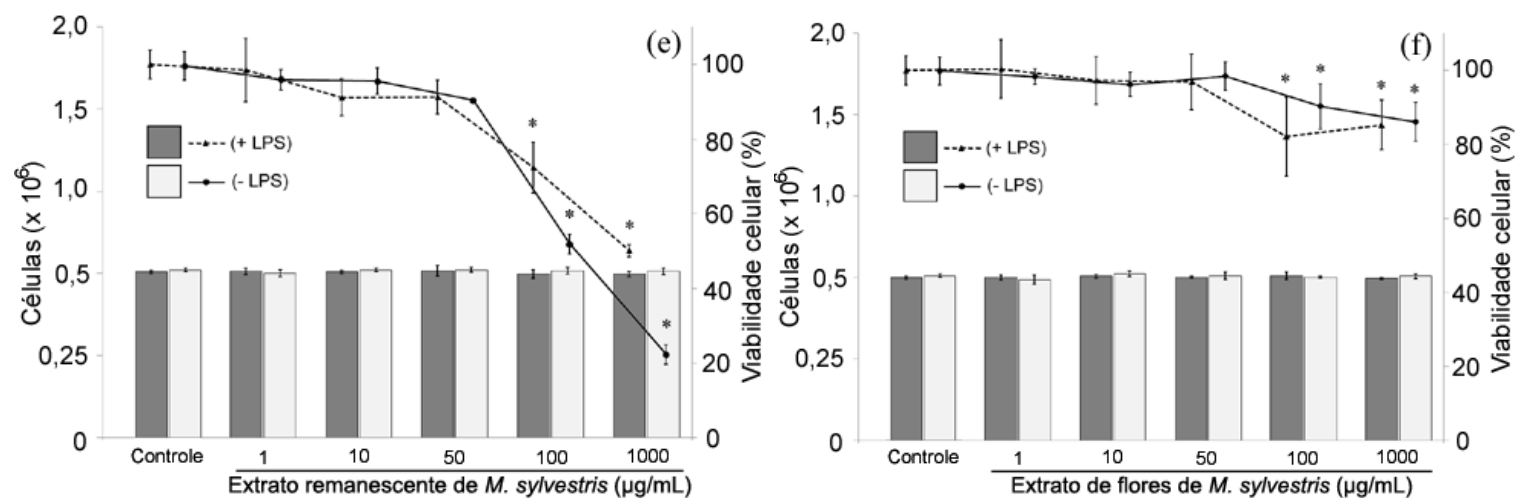


FIGURA 16 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *M. sylvestris* ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7: (a) EXTRATO BRUTO, (b) FRAÇÃO HEXANO, (c) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (d) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (e) FRAÇÃO REMANESCENTE, (f) EXTRATO DE FLORES

NOTA: * $p \leq 0,05$, em relação ao grupo controle



(Continuação) FIGURA 16 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *M. sylvestris* ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7: (a) EXTRATO BRUTO, (b) FRAÇÃO HEXANO, (c) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (d) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (e) FRAÇÃO REMANESCENTE, (f) EXTRATO DE FLORES

NOTA: * $p \leq 0,05$, em relação ao grupo controle

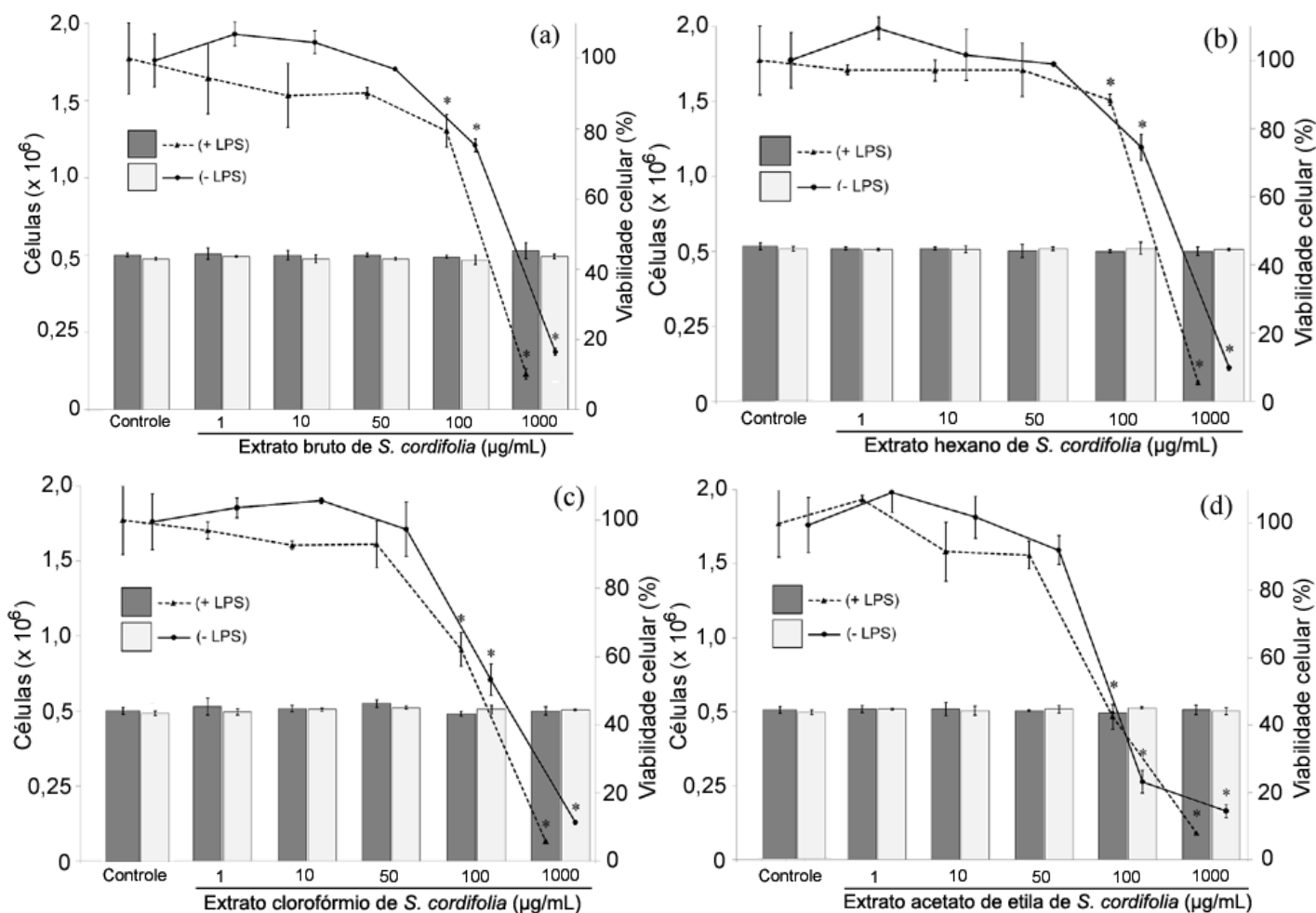
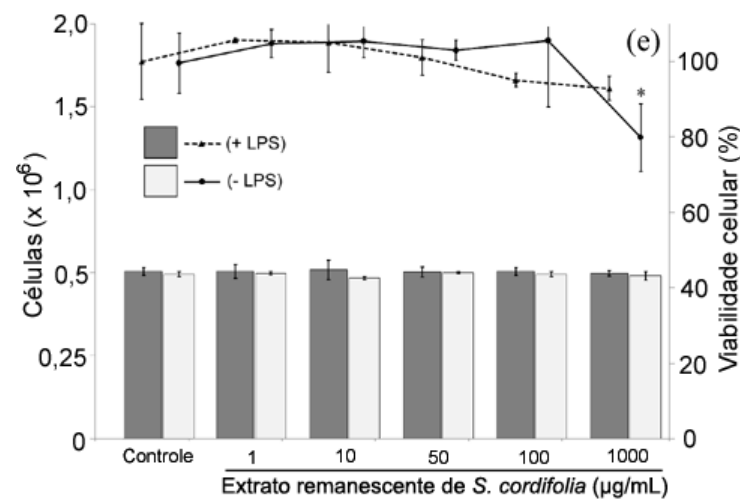


FIGURA 17 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *S. cordifolia* ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7: (a) EXTRATO BRUTO, (b) FRAÇÃO HEXANO, (c) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (d) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (e) FRAÇÃO REMANESCENTE

NOTA: * $p \leq 0,05$, em relação ao grupo controle



(Continuação) FIGURA 17 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *S. cordifolia* ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7: (a) EXTRATO BRUTO, (b) FRAÇÃO HEXANO, (c) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (d) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (e) FRAÇÃO REMANESCENTE

NOTA: * $p \leq 0,05$, em relação ao grupo controle

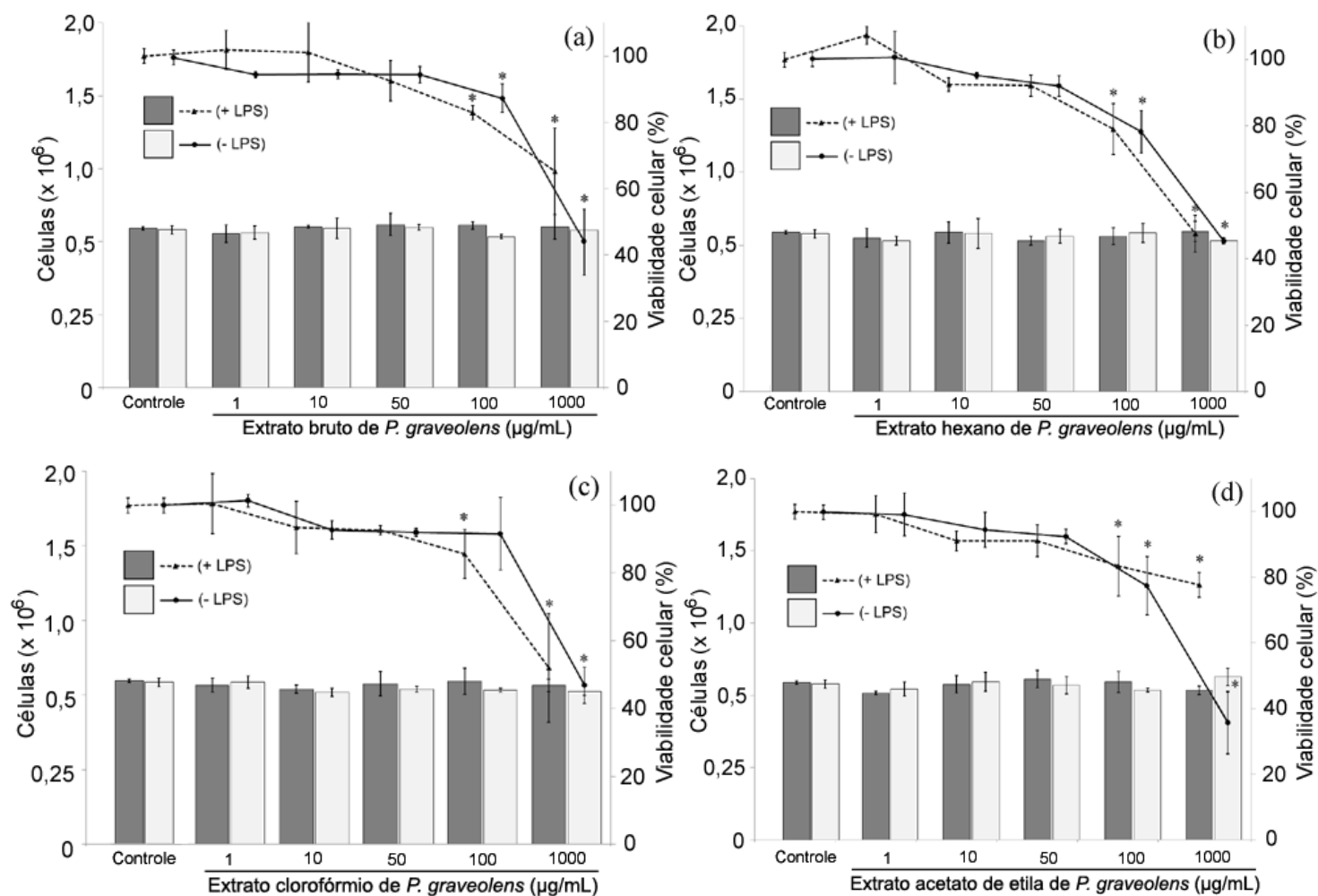
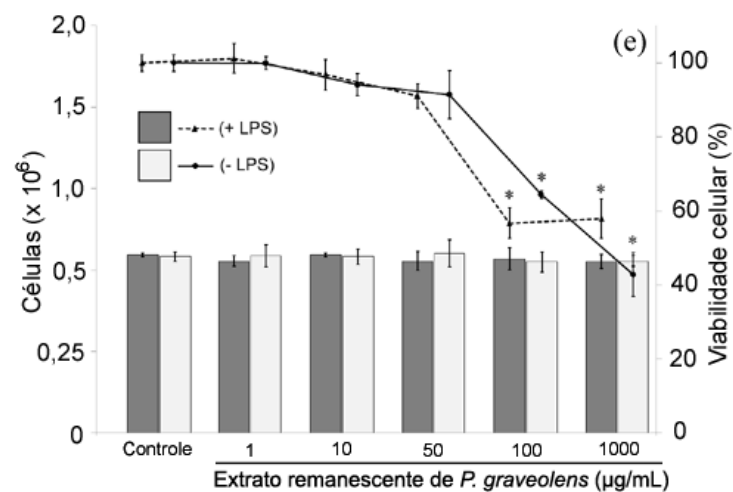


FIGURA 18 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *P. graveolens* ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7: (a) EXTRATO BRUTO, (b) FRAÇÃO HEXANO, (c) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (d) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (e) FRAÇÃO REMANESCENTE

NOTA: * $p \leq 0,05$, em relação ao grupo controle



(Continuação) FIGURA 18 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *P. graveolens* ASSOCIADOS OU NÃO COM LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7: (a) EXTRATO BRUTO, (b) FRAÇÃO HEXANO, (c) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (d) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (e) FRAÇÃO REMANESCENTE

NOTA: *p \leq 0,05, em relação ao grupo controle

Como pode ser observado nas Figuras 15 a 18, nenhum tratamento (LPS, dexametasona ou frações de extratos de plantas associados ou não com LPS) mostrou capacidade de promover a proliferação das células RAW 264.7. Todas as amostras mostraram contagens celulares nos cultivos muito próximas daquelas obtidas para a população controle, não sendo observadas diferenças estatísticas significativas nas contagens. Dessa forma, as variações nas quantificações de eicosanóides observadas nas amostras tratadas não podem ser relacionadas ao aumento ou diminuição do número de células durante as 24 horas do tratamento.

Em relação aos testes de viabilidade celular, a Figura 15 mostra que tanto o LPS quanto a dexametasona não se mostraram tóxicos para as células RAW 264.7, nas concentrações utilizadas neste estudo. Já para as células tratadas com frações de extrato de folhas ou flores de *M. sylvestris* (Figura 16), concentrações acima de 100 µg/mL de qualquer tratamento (associado ou não ao LPS) afetaram significativamente o percentual de viabilidade celular (valores de $p \leq 0,05$). Dos extratos de folhas utilizados, aquele oriundo da fração remanescente mostrou-se o menos tóxico para as células, onde mesmo em concentrações da ordem de 1000 µg/mL, aproximadamente 50% das células se mantiveram viáveis em tratamento associado ao LPS e aproximadamente 20% das células se mantiveram viáveis em tratamento isento de LPS. O tratamento utilizando extratos de flores de *M. sylvestris* mostrou-se o menos agressivo de todos, pois mesmo com concentrações superiores a 100 µg/mL, a taxa de viabilidade das células se manteve aproximadamente em 85%.

As células tratadas com frações de extrato de *S. cordifolia* (Figura 17) sofreram diminuições significativas em suas taxas de viabilidade também com concentrações acima de 100 µg/mL, com exceção do extrato oriundo da fração remanescente, onde valores de $p \leq 0,05$ somente foram observados na concentração de 1000 µg/mL não associada ao LPS. Similarmente, a Figura 18 mostra que células tratadas com frações de extrato de *P. graveolens* com concentração acima de 100 µg/mL apresentaram diferenças significativas nas taxas de viabilidade. Porém, comparando os extratos das três espécies, aqueles oriundos do *P. graveolens* foram os que menos diminuíram a

viabilidade celular, mantendo-se, independente da concentração, sempre superiores a 35%.

Assim, com o resultado dos testes de proliferação e viabilidade, foi possível definir quais as concentrações de frações de extrato seriam utilizadas na avaliação do efeito dos extratos sobre os eicosanóides. Foram utilizadas, em todos os tratamentos, as concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL de fração de extrato, as quais não alteram significativamente a contagem de células RAW 264.7 viáveis.

Nos Anexos I, II e III (respectivamente para *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens*) são mostradas as tabelas onde constam os valores de p obtidos através das avaliações estatísticas por ANOVA *one-way* seguido pelo teste t para amostras independentes, considerando os tratamentos em todas as concentrações de extrato (com e sem LPS) realizados para o teste de viabilidade celular.

3.3.3.2 Tratamento das células com LPS e dexametasona

O tratamento de células (notadamente macrófagos e fibroblastos) com LPS, um indutor de liberação de mediadores pró-inflamatórios, é um modelo clássico para avaliação de atividade anti-inflamatória de extratos de plantas (CHEUNG *et al.*, 2013). Considerando o uso das células RAW 264.7 na quantidade de $5,0 \times 10^5$ células/mL, foi estabelecida a concentração de 0,5 µg/mL de LPS para todos os experimentos. Como mostra a Figura 19, esta foi a maior concentração que não alterou de forma significativa a contagem de células viáveis no cultivo (analisada pelo método do MTT), comparada ao controle. Concentrações superiores, tais como 1,0 µg/mL ($p < 0,001$) e 1,5 µg/mL ($p < 0,001$) mostraram-se tóxicas para as células nas condições deste estudo, pois a contagem de células viáveis foi drasticamente reduzida (acima de 80% de morte celular) em comparação ao controle.

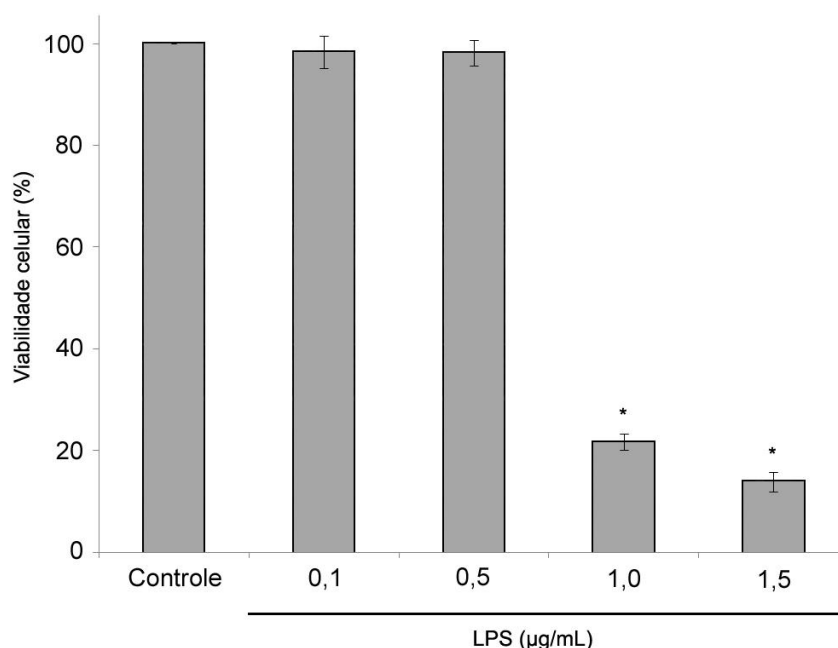


FIGURA 19 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LPS A 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: * $p \leq 0,05$, em relação ao grupo controle

O uso da dexametasona na quantidade de 10 µmol é bem estabelecido quando se utiliza células RAW 264.7, especialmente em trabalhos de avaliação de atividade anti-inflamatória de extratos de planta. Isto foi corroborado pelas análises de viabilidade (Figura 15) e pela análise de artigos de outros autores que trabalharam em condições similares (JEON *et al*, 2000; LIN, KUO, 2010; AHN *et al*, 2006).

3.3.4 Avaliação do efeito dos tratamentos com extratos de “Malvas”, LPS e dexametasona sobre a liberação de eicosanóides por células RAW 264.7

A avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de “Malvas” sobre as células RAW 264.7 foi realizado comparando-se a concentração dos metabólitos PGE_2 , PGD_2 , TXB_2 e $PGF_{2\alpha}$ entre amostras controle (que não receberam tratamento) e células que receberam algum tipo de tratamento, seja com o inibidor da liberação de mediadores inflamatórios (anti-inflamatório esteroide de referência dexametasona), com o estimulador da liberação de mediadores inflamatórios (LPS) ou com os extratos de planta nas concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL e dexametasona, associados ao LPS.

Todos os resultados foram normalizados em relação ao controle, ou seja, as áreas dos picos obtidos de cada analito em uma amostra que recebeu algum tratamento foram divididas pelas áreas dos picos dos analitos correspondentes nas amostras controle, obtidas de poços na mesma placa de cultivo. Este procedimento foi realizado para minimizar as variações naturais e inerentes aos testes biológicos. Além disso, estas variações se tornam ainda mais evidentes pelo fato de as quantificações dos analitos terem sido realizadas através de CLAE-EM/EM, uma técnica muito sensível.

A prostaglandina 6-ceto-PGF_{1α} (forma estável e analiticamente quantificável da PGI₂ ou prostaciclina) e o LTB₄ não foram avaliados porque as suas concentrações estavam abaixo dos limites de quantificação estabelecidos durante a validação do método. Assim, no sentido de evitar resultados inconclusivos e de manter a padronização do mesmo número de amostras na avaliação de cada tratamento (porque em algumas amostras os picos destes analitos eram sequer detectados), estes metabólitos não foram considerados neste estudo.

Como somente prostaglandinas e o tromboxano foram considerados, podemos dizer que os metabólitos avaliados denominam-se prostanóides, dado que ambos são eicosanóides sintetizados através da via da ciclooxygenase. Inclusive, alguns autores consideram estes metabólitos (PGE₂, PGD₂, TXB₂ e PGF_{2α}) como “prostanóides primários”, pois são moléculas muito estáveis e produzidas por sintases específicas a partir de um precursor comum oriundo das COX, a PGH₂ (MURPHY *et al*, 2005). Desta forma, o termo “prostanóide” exclui os leucotrienos, já que estes são produzidos através da ação da LOX.

Como descrito nos itens 3.3.4.1, 3.3.4.2 e 3.3.4.3, a concentração de LPS utilizada em todos os tratamentos proporcionou um aumento, quando comparado ao controle, de $3,63 \pm 0,53$ vezes para a PGE₂, $6,97 \pm 0,84$ vezes para PGD₂, $4,13 \pm 0,39$ vezes para TXB₂ e $4,13 \pm 0,51$ vezes para PGF_{2α}. Dessa forma, o uso do LPS na concentração 0,5 µg/mL não altera a contagem de células viáveis e ao mesmo tempo eleva a produção de mediadores inflamatórios, sendo adequado o seu uso como modelo de processo inflamatório *in-vitro*.

Já a dexametasona, utilizada como inibidor da liberação de mediadores inflamatórios, proporcionou uma redução, quando comparada ao controle, de $89,42 \pm 0,3\%$ a PGE_2 , de $90,59 \pm 0,5\%$ para a PGD_2 , de $86,08 \pm 1,7\%$ para a TXB_2 e de $93,43 \pm 0,5\%$ para a $PGF_{2\alpha}$. De forma análoga, quando utilizada em conjunto com o LPS, a dexametasona também foi capaz de inibir a produção de mediadores, mostrando que é um anti-inflamatório eficiente mesmo quando as células são tratadas com LPS. Neste caso, quando comparadas ao controle, as taxas de redução foram de $87,63 \pm 1,5\%$ para a PGE_2 , $85,52 \pm 0,1\%$ para a PGD_2 , $58,19 \pm 4,9\%$ para TXB_2 e $85,31 \pm 1,0\%$ para a $PGF_{2\alpha}$. A dexametasona é utilizada classicamente como anti-inflamatória por, de maneira geral, inibir a fosfolipase A2 citosólica (cPLA2). Esta enzima catalisa a liberação do ácido araquidônico, substrato-limite para a ação da COX e da LOX, que produzem prostanoídes e leucotrienos respectivamente (SUN *et al.*, 2006). Dessa forma, isto garante a funcionalidade do modelo, pois ocorre a diminuição da produção de todos os derivados eicoisanóides que o método analítico desenvolvido neste trabalho se propõe a quantificar (mesmo os que não tenham sido considerados, como o LTB_4). Dessa forma, um AINE ou qualquer anti-inflamatório que seja apenas bloqueador de COX não seria indicado. Quando a dexametasona se liga ao gene de resposta aos glucocorticóides no núcleo celular, ocorre redução da inflamação através de dois principais mecanismos. O primeiro é relacionado ao aumento da transcrição dos genes que codificam proteínas anti-inflamatórias tais como lipocortina-1, “proteína inibitória de leucócitos secretores” e antagonistas do receptor de interleucina-1 (IL-1). O segundo é relacionado à diminuição da transcrição de genes que codificam proteínas pró-inflamatórias, tais como citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, TNF- α , etc), quimiocinas, enzimas inflamatórias (fosfolipase A2 citoplasmática e óxido nítrico sintase), endotelina-1, receptores NK1 e NK2 e moléculas de adesão (ICAM-1) (CHU *et al.*, 2014).

Os valores de p dos testes de ANOVA e dos Testes t aplicados para verificar as diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados com LPS e dexametasona é mostrado no Anexo IV, na forma de uma tabela. As avaliações estatísticas aplicadas mostram que houve diferenças significativas entre as

amostras controle e as amostras tratadas para todos os metabólitos analisados.

3.3.4.1 Extratos de *M. sylvestris*

As Figuras 20 a 25 mostram o efeito dos tratamentos sobre a liberação de prostanóides pelas células RAW 264.7 quando é utilizado, respectivamente, extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração remanescente de folhas e extrato de flores de *M. sylvestris*.

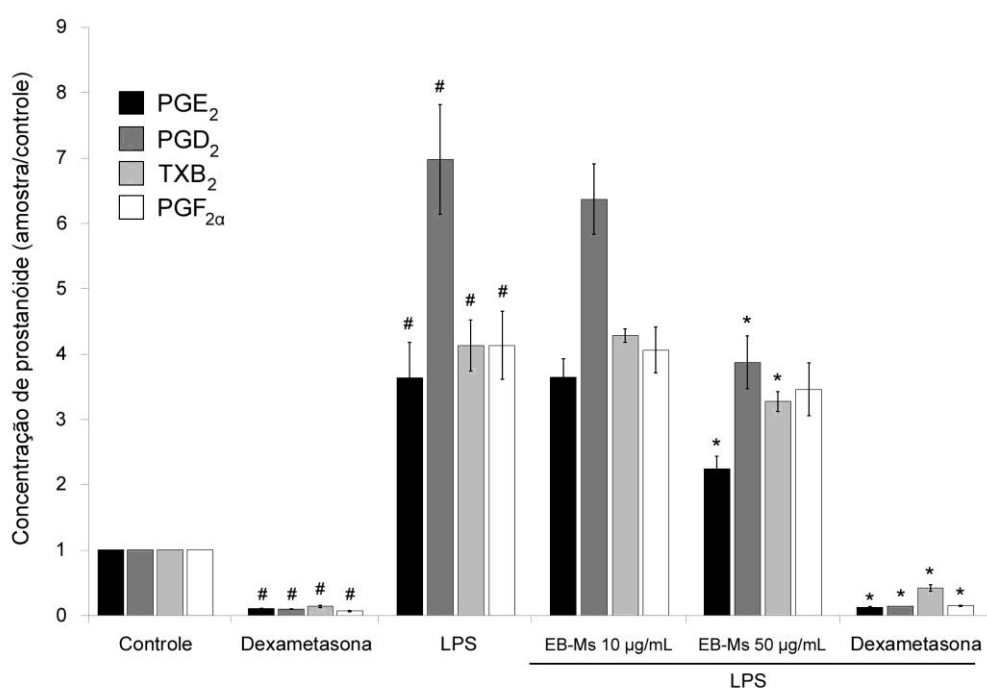


FIGURA 20 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DO EXTRATO BRUTO DE *M. sylvestris* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanóides liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

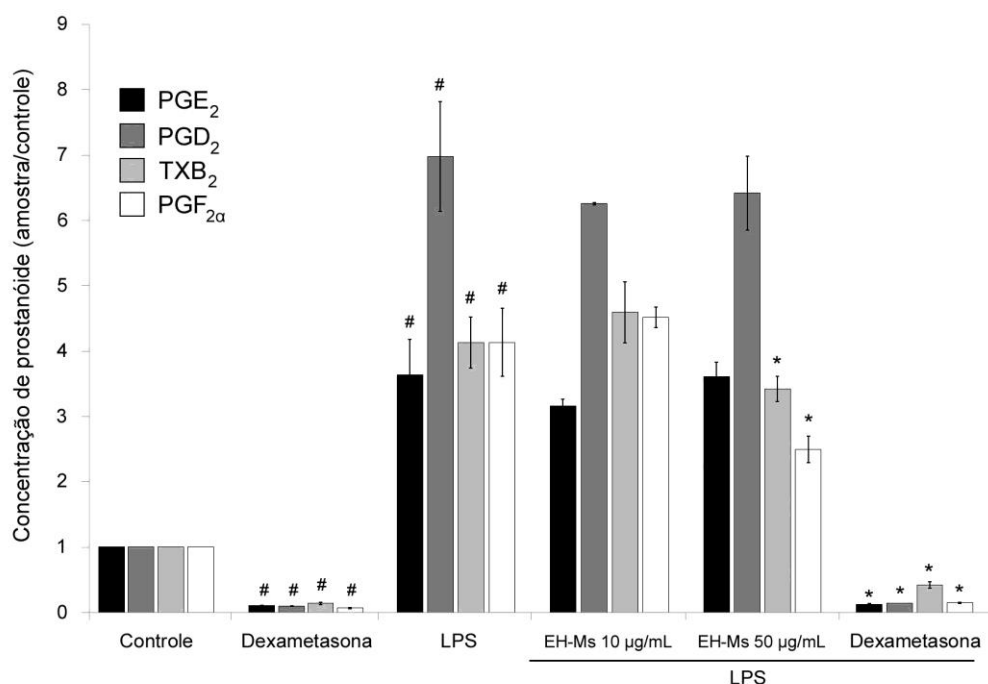


FIGURA 21 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE *M. sylvestris* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

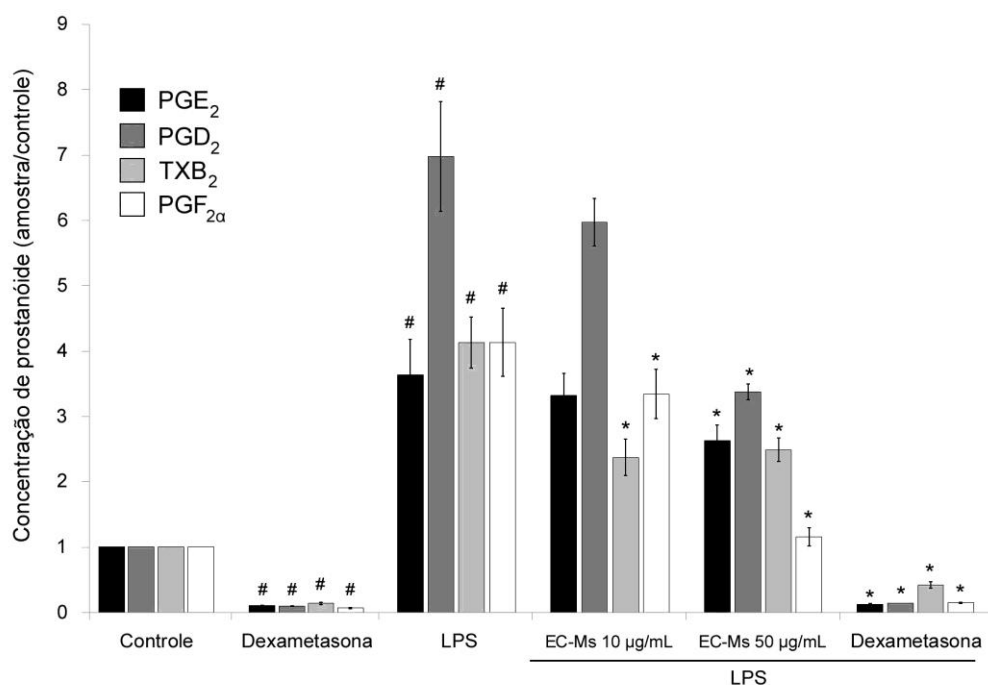


FIGURA 22 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE *M. sylvestris* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

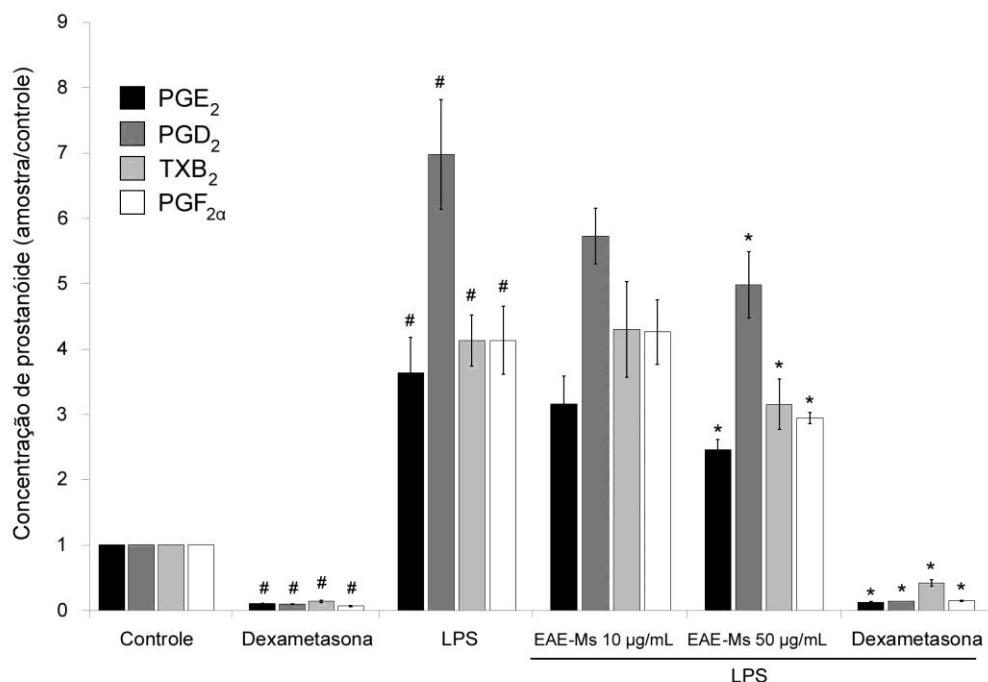


FIGURA 23 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE *M. sylvestris* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoídes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

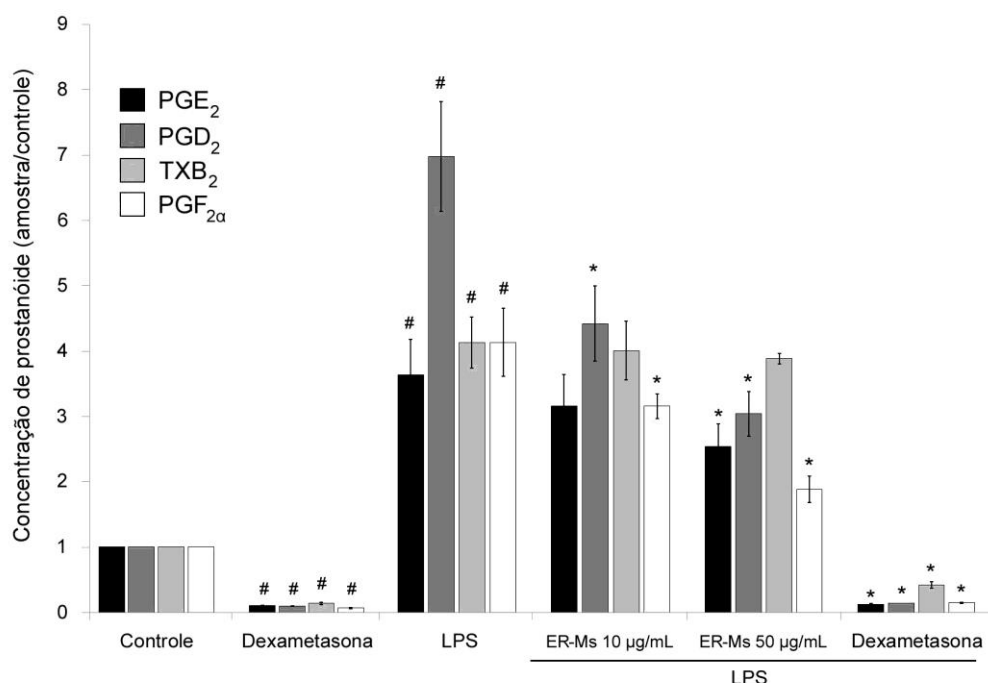


FIGURA 24 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO REMANESCENTE DO EXTRATO DE *M. sylvestris* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoídes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

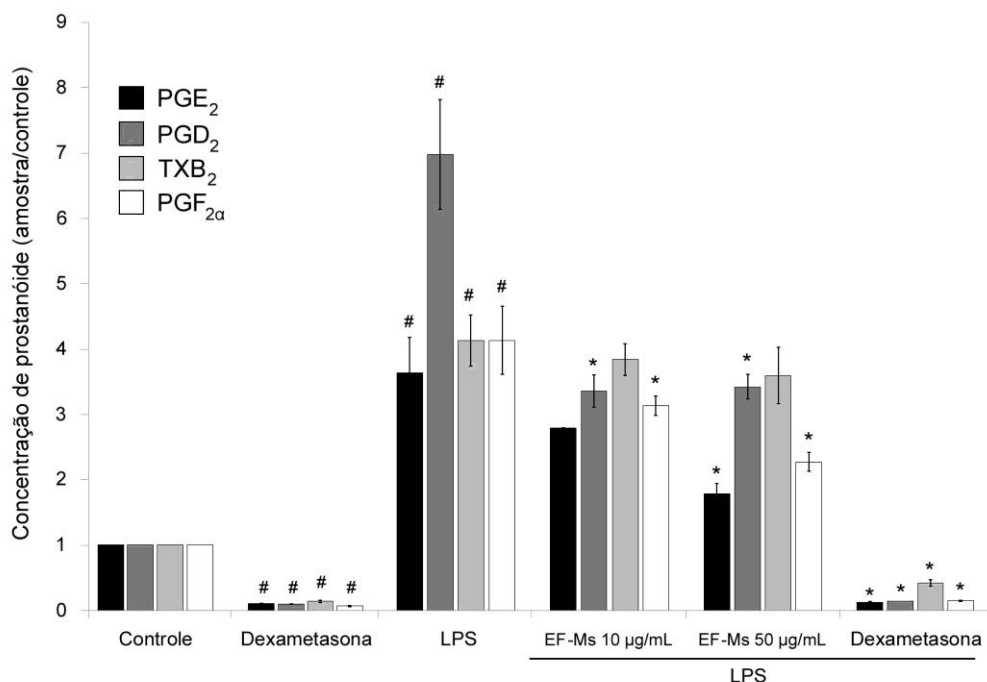


FIGURA 25 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DO EXTRATO DE FLORES DE *M. sylvestris* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoídes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

Para avaliar as diferenças estatísticas entre as amostras que receberam tratamento com algum extrato de *M. sylvestris* associado ao LPS e as amostras que receberam somente LPS, é mostrada no Anexo V uma tabela com todos os valores de p dos testes de ANOVA e t obtidos em cada comparação.

Para todos os prostanoídes, em geral é percebida uma maior diferença quando o tratamento é realizado com 50 µg/mL. Porém, em alguns casos (como na avaliação da concentração de PGD₂ em tratamento com fração hexano), praticamente não há diferenças quando o tratamento é realizado com 10 µg/mL ou 50 µg/mL de extrato.

A Tabela 9 mostra a variação percentual observada na concentração de cada prostanoíde avaliado (comparadas com as amostras tratadas com LPS), considerando a adição de 10 µg/mL e 50 µg/mL de extrato bruto de folhas e flores e frações de extratos de folhas de *M. sylvestris*.

TABELA 9 – VARIAÇÕES PERCENTUAIS NAS CONCENTRAÇÕES DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} NAS AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATOS DE *M. sylvestris*, EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS TRATADAS COM LPS

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (µg/mL)	VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE PROSTANÓIDES (%)			
			PGE ₂	PGD ₂	TXB ₂	PGF _{2α}
<i>M. sylvestris</i>	Bruto	10	0,20	-8,59	3,80	-1,68
		50	-38,16	-44,45	-20,71	-16,71
	Hexano	10	-13,21	-10,31	11,20	9,23
		50	-0,83	-7,98	-17,26	-39,60
	Clorofórmio	10	-8,85	-14,39	-42,58	-19,17
		50	-27,77	-51,61	-39,75	-71,95
	Acetato de Etila	10	-13,24	-17,84	4,10	3,09
		50	-32,32	-28,58	-23,64	-28,69
	Remanescente	10	-13,09	-36,61	-2,98	-23,64
		50	-30,18	-56,42	-5,96	-54,41
	Flores	10	-23,26	-51,85	-7,04	-24,23
		50	-50,85	-34,58	-12,99	-44,97

FONTE: O autor, (2015)

De maneira geral, observa-se uma relação dose-resposta para quase todos os tratamentos, no que tange à diminuição dos prostanóides avaliados. Assim, salvo poucas exceções (fração hexano para PGE₂ e PGD₂, e extrato flores para PGD₂), a concentração de 50 µg/mL de extrato mostra uma maior redução na concentração de prostanóides do que a de 10 µg/mL.

Todas as frações de extrato mostraram, para algum prostanóide, taxas de redução superiores a 30%. Porém, considerando o tratamento com 50 µg/mL, as maiores taxas de redução por prostanóide foram com o extrato flores para PGE₂ (com redução de 50,85%), extrato remanescente para PGD₂ (com redução de 56,42%), extrato clorofórmio para TXB₂ e PGF_{2α} (com reduções de 39,75% e 71,95%, respectivamente). Ainda considerando apenas os tratamentos com 50 µg/mL e fazendo-se a média aritmética de taxas de redução dos quatro prostanóides, podem ser classificados por ordem decrescente a fração clorofórmio (-47,77%), fração remanescente (-36,74%), extrato de flores (-35,84%), extrato bruto (-30,00%), fração acetato de etila (-28,30%) e fração hexano (-16,41%).

Assim, considerando os extratos brutos, que são os mais usuais e fáceis de serem obtidos (pois independem de solventes orgânicos tais como hexano, acetato de etila e clorofórmio) e que se apresentam como principal produto de drogas vegetais preparadas por infusões, decocotos e macerados (o que caracteriza o uso tradicional, como recomenda a RDC N° 10, de 9 de março de

2010), o extrato das flores de *M. sylvestris* apresenta maior efetividade na redução dos mediadores prostanoídes que o extrato das folhas.

A importância que é dada às flores da *M. sylvestris* em produtos obtidos na Itália destinados ao preparo de infusos desta planta pode ser vista nos rótulos apresentados na Figura 26. As flores da planta sempre aparecem em destaque nas embalagens dos produtos, denotando que os benefícios oriundos do seu consumo são atrelados principalmente à presença destas flores.



FIGURA 26 – RÓTULOS DE PRODUTOS DESTINADOS AO PREPARO DE INFUSOS, CONTENDO PARTES AÉREAS DE *M. sylvestris*

NOTA: Rótulos de produtos adquiridos pelo Autor, na Itália, em 2012

De modo geral, como podem ser observados na Figura 27-A, estes produtos italianos são compostos por uma mistura de flores e folhas trituradas. De forma geral, as flores secas apresentam-se com a coloração roxa, ainda que algumas marcas apresentem flores de cor vermelha. Adicionalmente, dependendo da marca, o volume de flores pode aproximar-se de 50% do total do material vegetal destinado ao preparo do infuso. Por outro lado, como pode visto na Figura 27-B, produtos contendo partes aéreas de *M. sylvestris* destinados ao preparo de infuso obtidos no mercado brasileiro são compostos exclusivamente por folhas da planta. O Capítulo 2 desta Tese relata a aquisição de 60 amostras comerciais de “Malvas”, obtidas no mercado brasileiro. Apesar de todos os produtos que foram classificados como *M.*

sylvestris terem sido avaliados morfoanatomicamente, nenhum deles continha flores desta espécie (vide Capítulo 2 desta tese).

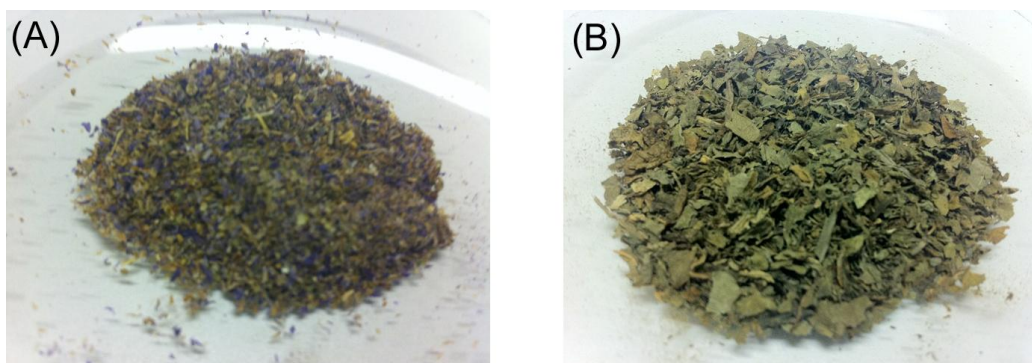


FIGURA 27 – (A) PRODUTO DE ORIGEM ITALIANA, CONTENDO MISTURA DE FOLHAS E FLORES DE *M. sylvestris* DESTINADO AO PREPARO DE INFUSOS; (B) FOLHAS DE *M. sylvestris* OBTIDAS NO BRASIL, DESTINADO AO PREPARO DE INFUSOS.

FONTE: O autor, (2013)

Dessa forma, os infusos preparados com produtos obtidos no Brasil ou na Itália apresentam colorações bastante distintas, o que pode ser visualizado na Figura 28. Produtos que contém flores dão origem a um infuso com coloração avermelhada, dada a presença de compostos da família das malvidinas, que tipicamente apresentam coloração avermelhada quando em solução aquosa levemente ácida.

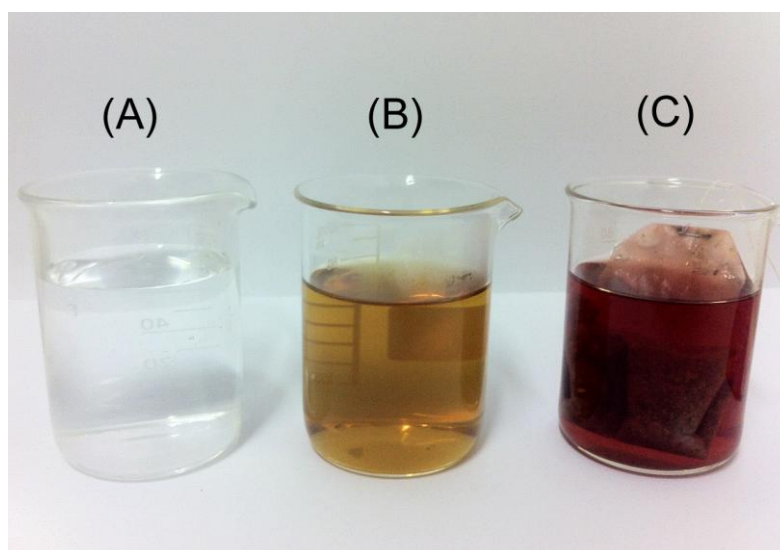


FIGURA 28 – INFUSOS PREPARADOS COM PARTES AÉREAS DE *M. sylvestris*. (A) ÁGUA DESTILADA, PARA COMPARAÇÃO; (B) INFUSO PREPARADO COM FOLHAS (C) INFUSO PREPARADO COM MISTURA DE FOLHAS E FLORES

NOTA: A Figura (B) mostra o infuso filtrado de folhas de *M. sylvestris*, pois o produto que deu origem a este infuso não foi fornecido na forma de sachê. A Figura (C) mostra um infuso obtido pela manutenção do sachê durante 5 minutos em contato com água a 100°C, como recomenda a instrução de preparo na embalagem do produto

Assim, ao contrário do Brasil, onde a *M. sylvestris* disponível comercialmente é encontrada na maior parte das vezes na forma de folhas, na Itália o uso de produtos derivados desta espécie com a presença de flores é muito reconhecido e estimulado. O conhecimento etnobotânico se insere neste contexto, onde diversos autores relatam o uso de flores desta espécie (em conjunto ou não com folhas) para o alívio dos sintomas de inflamações de garganta, dores de dente, bronquites e até mesmo como diuréticas e laxativas, especialmente para crianças (LEPORATTI, CORRADI, 2001; SCHERRER *et al.*, 2005; De NATALE, POLLIO, 2007).

3.3.4.2 Extratos de *S. cordifolia*

As Figuras 29 a 33 mostram o efeito dos tratamentos sobre a liberação de prostanoídes pelas células RAW 264.7 quando é utilizado, respectivamente, extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração remanescente de folhas de *S. cordifolia*.

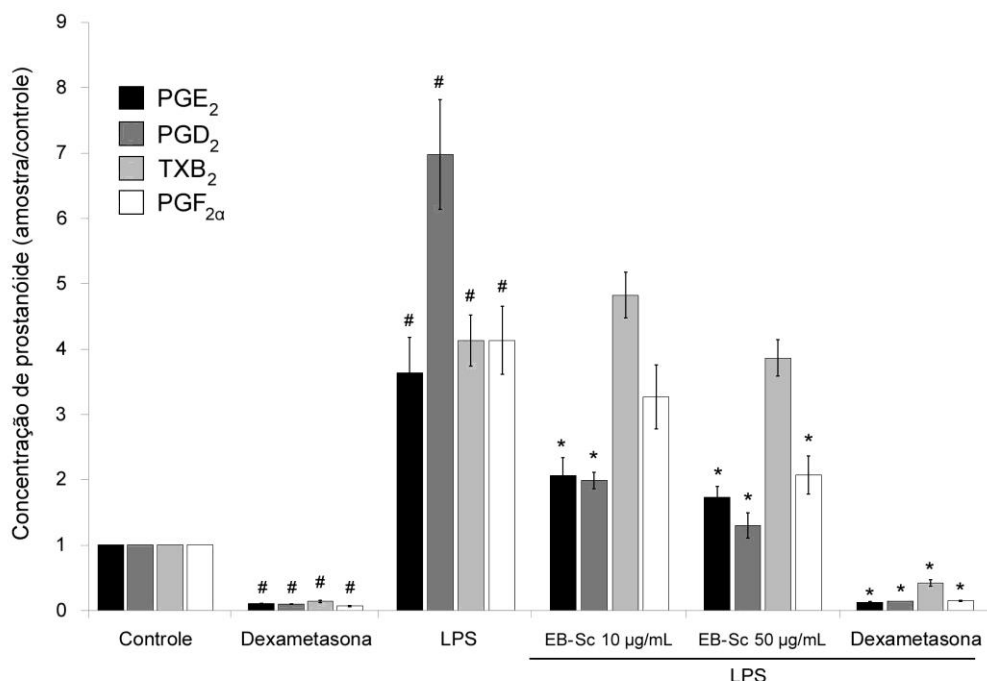


FIGURA 29 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DO EXTRATO BRUTO DE *S. cordifolia* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

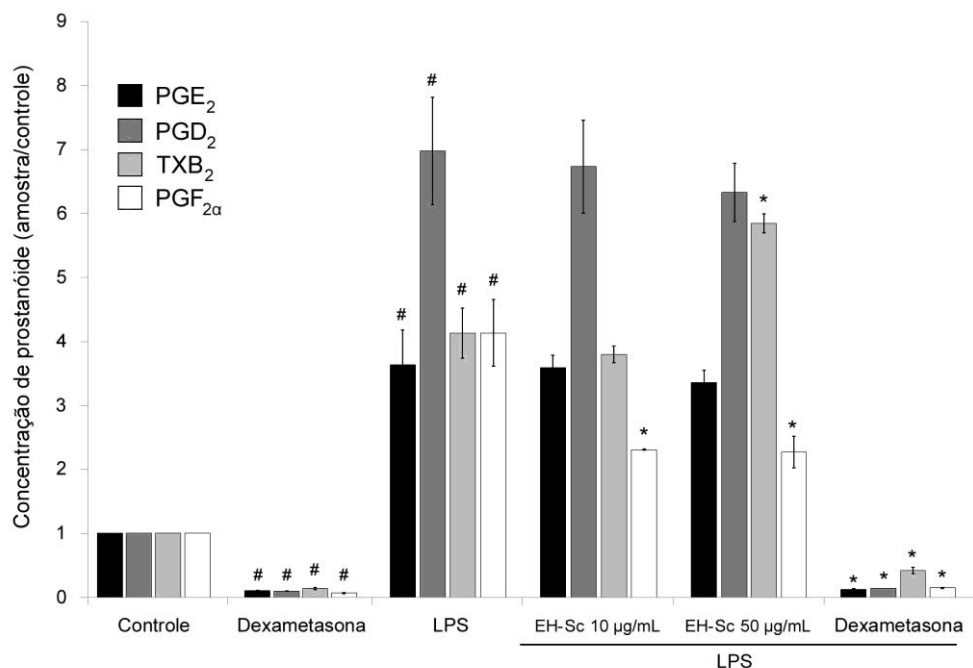


FIGURA 30 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE *S. cordifolia* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanóides liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

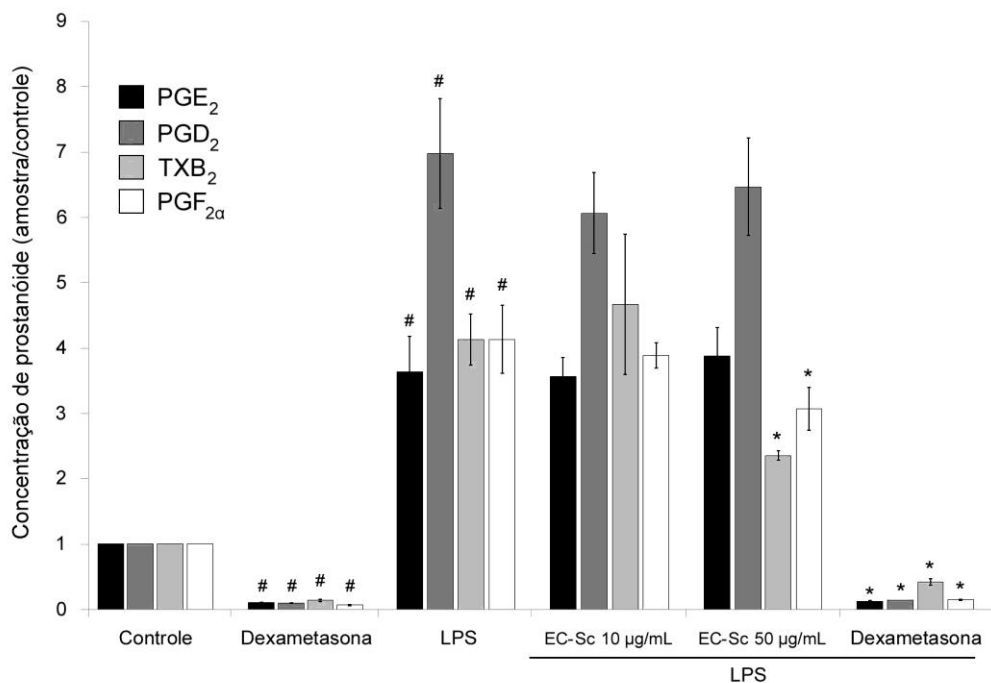


FIGURA 31 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE *S. cordifolia* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanóides liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

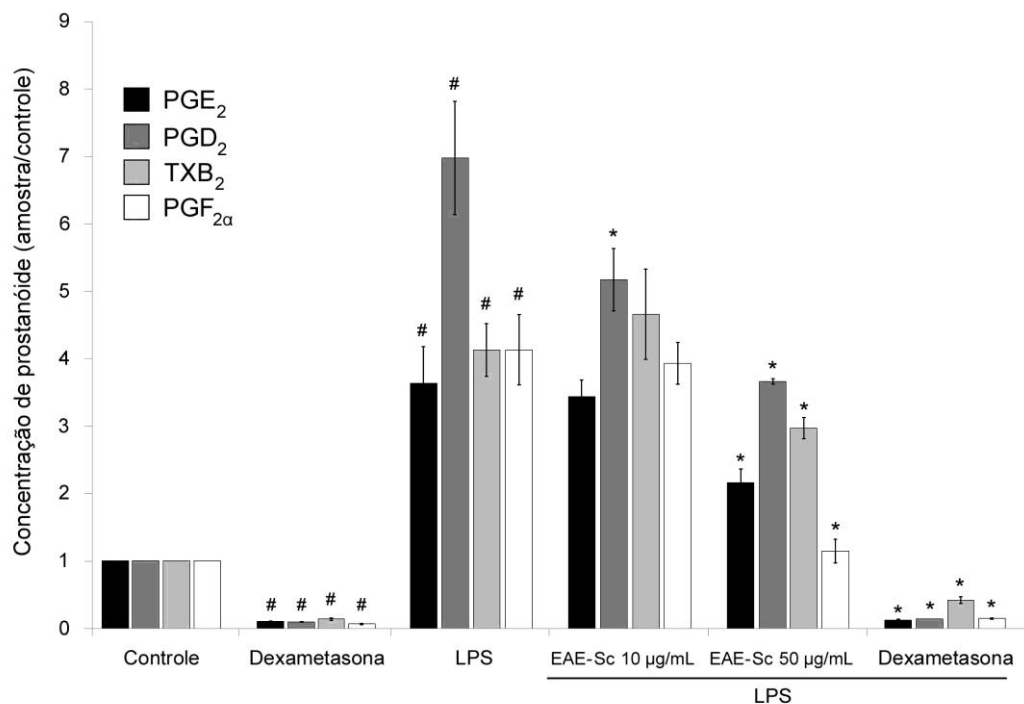


FIGURA 32 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE *S. cordifolia* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

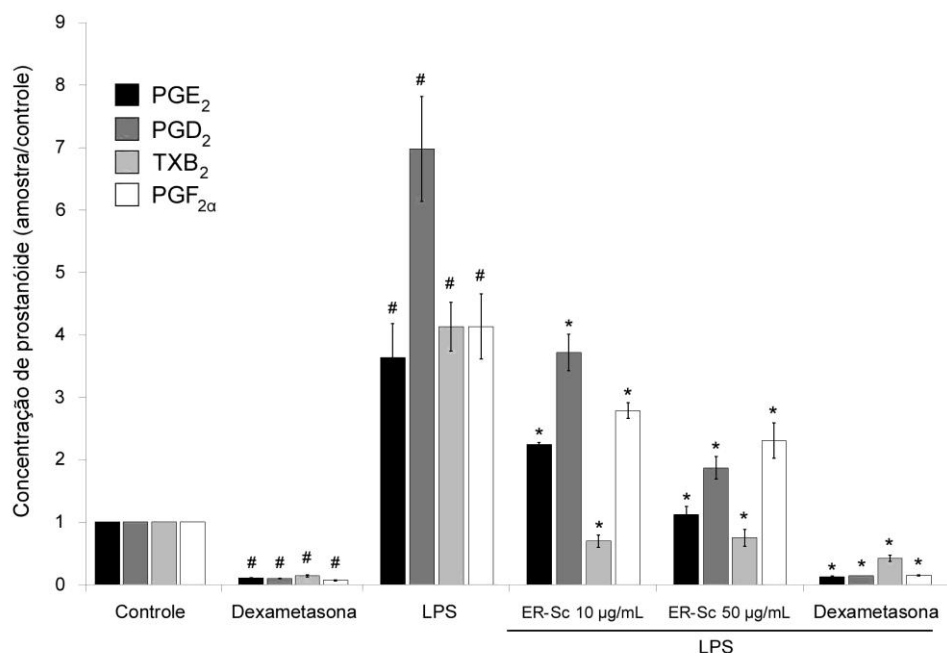


FIGURA 33 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO REMANESCENTE DO EXTRATO DE *S. cordifolia* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

As diferenças estatísticas (em termos de valores de p dos testes de ANOVA e testes t) entre as amostras que receberam tratamento com algum extrato de *S. cordifolia* associado ao LPS e as amostras que receberam somente LPS, são mostradas na forma de uma tabela no Anexo VI.

Analogamente ao que ocorreu com os tratamentos com extratos de *M. sylvestris*, os tratamentos com extratos de *S. cordifolia* apresentam, de maneira geral, maior diferença quando é aplicada a concentração de 50 µg/mL. Os valores de p dos Testes t mostram que, quando é utilizado tratamento com frações hexano e clorofórmio, não há diferença na quantificação tanto de PGE₂ quanto de PGD₂.

A Tabela 10 mostra a variação percentual observada na concentração de cada prostanóide avaliado (comparadas com as amostras tratadas com LPS), considerando a adição de 10 µg/mL e 50 µg/mL de extrato bruto de folhas e frações de extratos de folhas de *S. cordifolia*.

TABELA 10 – VARIAÇÕES PERCENTUAIS NAS CONCENTRAÇÕES DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} NAS AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATOS DE *S. cordifolia*, EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS TRATADAS COM LPS

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO (µg/mL)	VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE PROSTANÓIDES (%)			
			PGE ₂	PGD ₂	TXB ₂	PGF _{2α}
<i>S. cordifolia</i>	Bruto	10	-43,22	-71,46	16,45	-20,44
		50	-52,46	-81,34	-6,48	-49,78
	Hexano	10	-1,36	-3,46	-8,04	-44,35
		50	-7,77	-9,19	41,45	-45,05
	Clorofórmio	10	-2,13	-13,05	13,06	-5,84
		50	6,52	-7,22	-43,04	-25,63
	Acetato de etila	10	-5,51	-25,80	12,81	-4,79
		50	-40,50	-47,49	-28,09	-72,17
	Remanescente	10	-38,34	-46,69	-83,18	-32,60
		50	-69,08	-73,18	-81,87	-44,25

FONTE: O autor, (2015)

Nos tratamentos com extratos de *S. cordifolia*, de modo geral também se observa uma relação dose-resposta quando são considerados os tratamentos com 10 µg/mL e 50 µg/mL, sendo que a concentração maior causa uma maior supressão na liberação de todos os mediadores inflamatórios. Algumas exceções a esta tendência são as concentrações de TXB₂ quando são aplicadas frações hexano e remanescente, e as concentrações de PGE₂ e PGD₂ quando é considerado o tratamento com fração clorofórmio. Analisando

apenas os tratamentos com concentração de 50 µg/mL, observa-se uma redução de prostanóides sempre superior a 6%, podendo chegar a taxas superiores a 81% (extrato bruto e fração remanescente, para PGD₂ e TXB₂, respectivamente). Reduções bastante significativas também são observadas em tratamentos com extrato bruto (-52,46% para PGE₂ e -49,78% para PGF_{2α}), fração hexano (-45,05% para PGF_{2α}), fração acetato de etila (-47,49% para PGD₂) e fração remanescente (-69,08% para PGE₂, -73,18% para PGD₂).

Salvo com tratamentos utilizando fração remanescente, o TXB₂ apresentou em alguma contração de todos os demais tratamentos um aumento na concentração de prostanóides. Este aumento chegou a 41,45% quando foi utilizada a fração hexano na concentração 50 µg/mL. Ainda que não seja uma relação dose-reposta dependente (pois dependendo da fração o aumento ocorre com o tratamento a 10 µg/mL ou a 50 µg/mL), é possível que haja alguma substância nestes extratos que estimule a enzima tromboxano sintase, que em conjunto com a COX, é responsável pela produção de tromboxanos, especificamente (CATHCART *et al.*, 2014).

Classificando-se em função da média aritmética das taxas de redução dos quatro prostanóides, observa-se como mais efetivas (em ordem decrescente) a fração remanescente (-67,09%) seguida do extrato bruto (-47,51%), fração acetato de etila (-47,06%), fração clorofórmio (-17,34%) e fração hexano (-5,14%).

3.3.4.3 Extratos de *P. graveolens*

As Figuras 34 a 38 mostram o efeito dos tratamentos sobre a liberação de prostanóides pelas células RAW 264.7 quando é utilizado, respectivamente, extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração remanescente de folhas de *P. graveolens*.

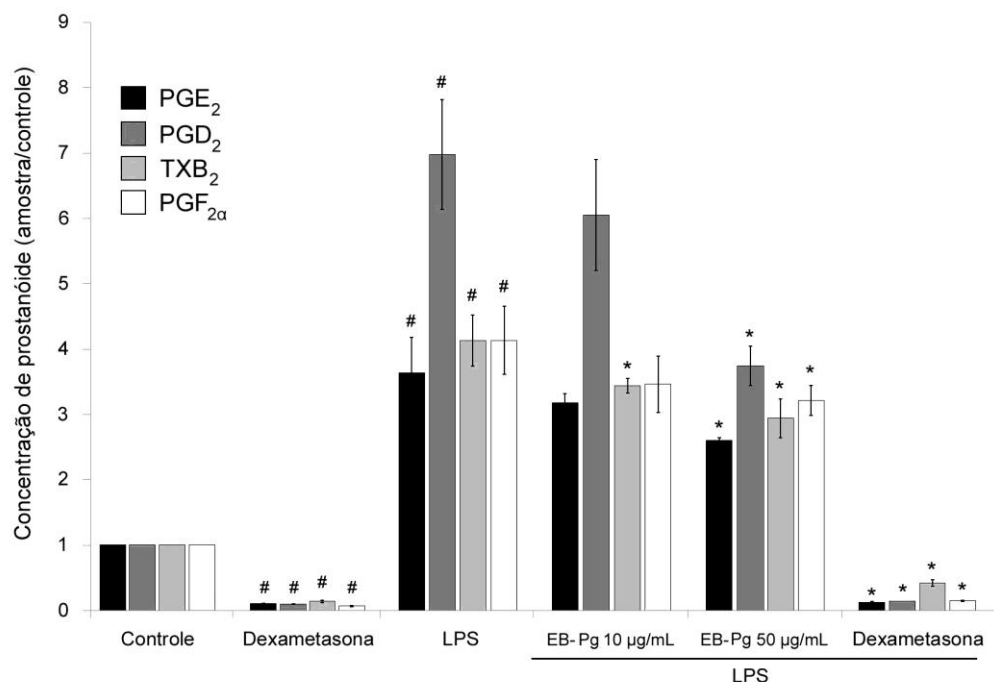


FIGURA 34 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DO EXTRATO BRUTO DE *P. graveolens* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

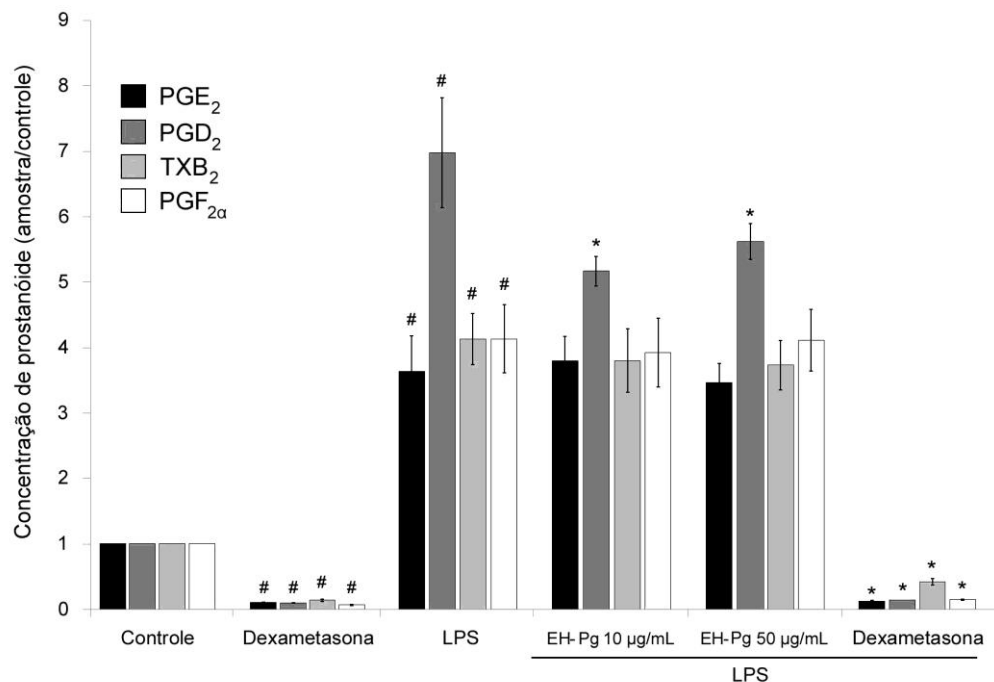


FIGURA 35 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DE *P. graveolens* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

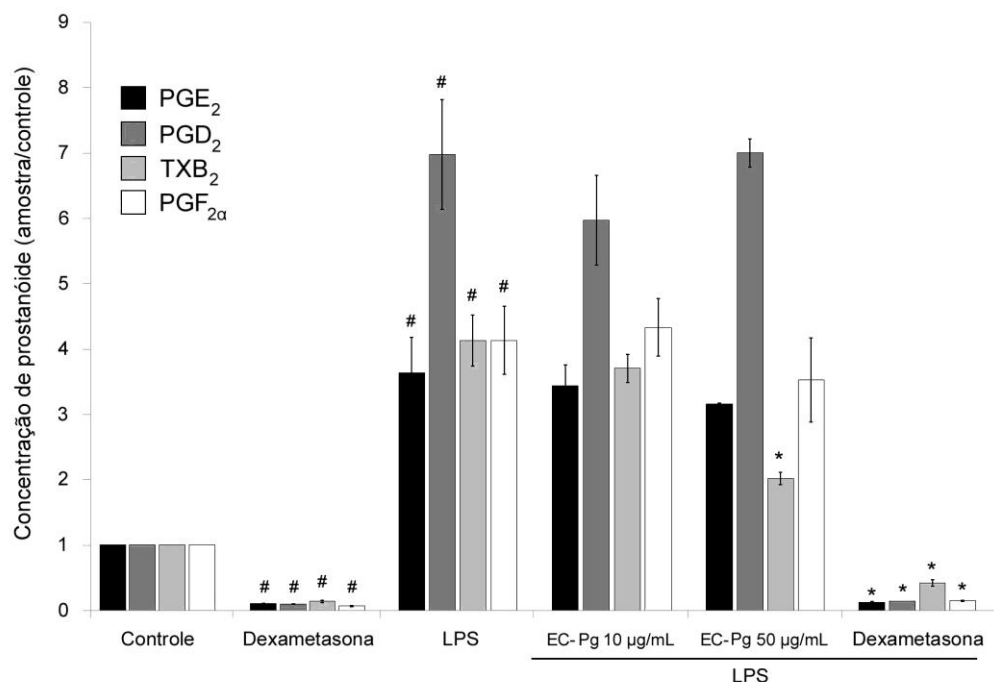


FIGURA 36 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO EXTRATO DE *P. graveolens* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

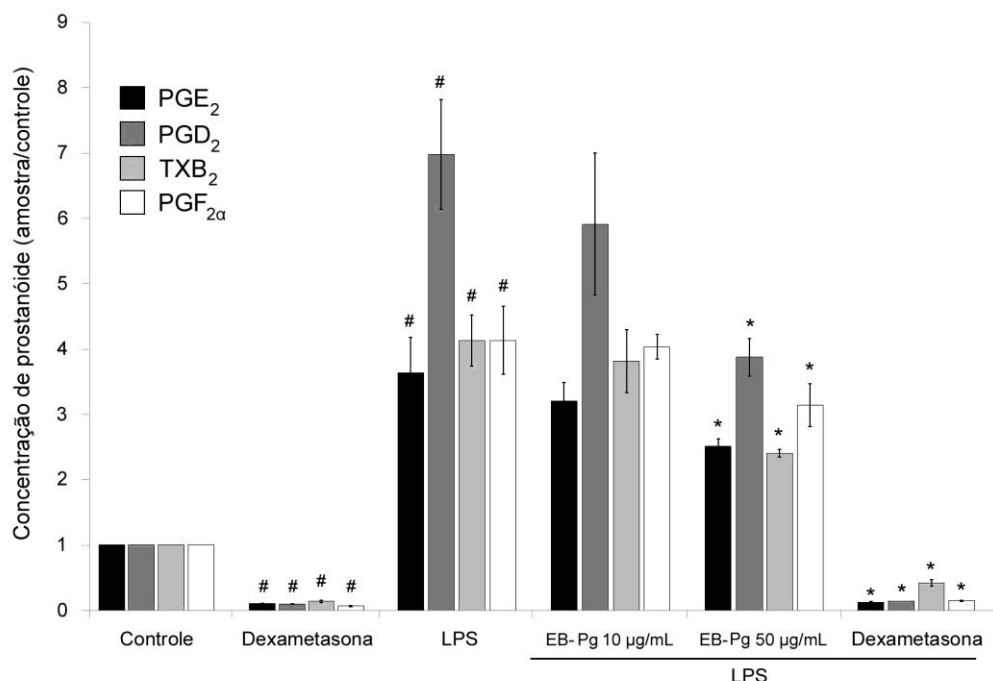


FIGURA 37 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO DE *P. graveolens* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

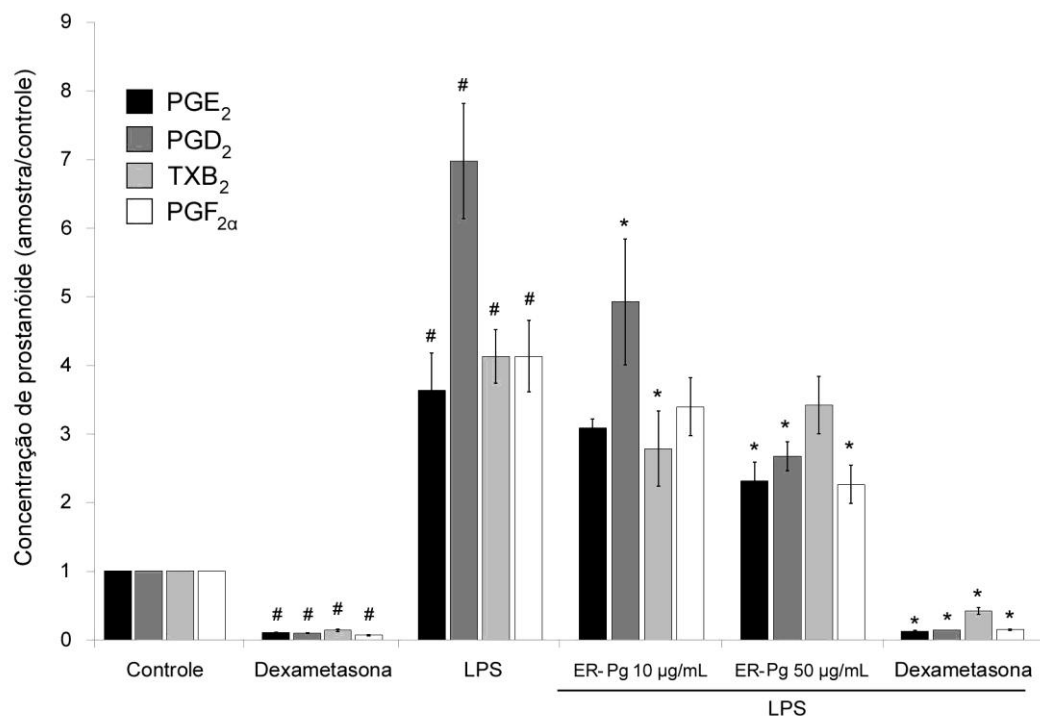


FIGURA 38 – EFEITO DA DEXAMETASONA (ISOLADA E EM CONJUNTO COM LPS), DO LPS E DA FRAÇÃO REMANESCENTE DO EXTRATO DE *P. graveolens* A 10 µg/mL e 50 µg/mL EM CONJUNTO COM LPS, SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE₂, PGD₂, TXB₂ E PGF_{2α} DE CÉLULAS RAW 264.7.

NOTA: As barras representam a razão entre a concentração de prostanoïdes liberados nos grupos que receberam tratamento e no grupo controle. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle; *p<0,05 quando comparado com o grupo que recebeu tratamento com LPS

Para avaliar as diferenças estatísticas entre as amostras que receberam tratamento com algum extrato de *P. graveolens* associado ao LPS e as amostras que receberam somente LPS, são mostrados na forma de uma tabela no Anexo VII os valores de p dos testes de ANOVA e t obtidos em cada comparação.

Com excessão das frações hexano e clorofórmio, com cujo tratamento foi verificada diferença significativa apenas na concentração de PGD₂ e TXB₂, respectivamente, todos os outros tratamentos causaram diminuições (ainda que menores que com as outras duas espécies) significativas. Assim como ocorreu com as outras plantas, na maior parte dos casos a tendência de maiores diferenças com a aplicação de extratos na concentração de 50 µg/mL se manteve.

A Tabela 11 mostra a variação percentual observada na concentração de cada prostanoïde avaliado (comparadas com as amostras tratadas com LPS),

considerando a adição de 10 µg/mL e 50 µg/mL de extrato bruto de folhas e frações de extratos de folhas de *P. graveolens*.

TABELA 11 – VARIAÇÕES PERCENTUAIS NAS CONCENTRAÇÕES DE PGE₂, PGD₂ TXB₂ E PGF_{2α} NAS AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATOS DE *P. graveolens*, EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS TRATADAS COM LPS

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO (µg/mL)	VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE PROSTANÓIDES (%)			
			PGE ₂	PGD ₂	TXB ₂	PGF _{2α}
<i>P. graveolens</i>	Bruto	10	-12,59	-13,21	-16,78	-16,21
		50	-26,49	-42,35	-26,83	-20,28
	Hexano	10	4,25	-25,85	-8,02	-5,05
		50	-4,72	-19,36	-9,70	-0,49
	Clorofórmio	10	-5,39	-14,36	-10,27	4,81
		50	-13,26	0,40	-51,18	-14,58
	Acetato de etila	10	-11,87	-15,20	-7,54	-2,32
		50	-31,00	-44,41	-41,75	-23,98
	Remanescente	10	-15,09	-29,34	-32,57	-17,79
		50	-36,36	-61,64	-17,12	-45,23

FONTE: O autor, (2015)

Para o *P. graveolens*, para quase todos os tratamentos se observa uma relação dose-resposta considerando as concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL. Os casos em que as quedas nas concentrações de prostanóides não seguem esta tendência são a fração hexano (concentrações de PGD₂ e PGF_{2α}), a fração clorofórmio (concentrações de PGD₂) e fração acetato de etila e remanescente (concentrações de TXB₂). Alguns tratamentos utilizando-se a concentração de 10 µg/mL mostraram resultados expressivos, tais como as reduções em 25,85% na concentração de PGD₂ com a fração hexano e as reduções em 29,34% e 32,57% nas concentrações de PGD₂ e TXB₂, respectivamente, com a aplicação da fração remanescente.

Considerando-se os tratamentos com concentração de 50 µg/mL, foram obtidas taxas de reduções da ordem de 60%, como é o caso da variação na concentração de PGD₂ utilizando extrato remanescente. Reduções bastante significativas também são observadas em tratamentos com extrato bruto (redução de 42,35% para PGD₂), fração clorofórmio (redução de 51,18% para TXB₂) e fração acetato de etila (reduções de 44,41% e 41,75% para PGD₂ e TXB₂, respectivamente).

Considerando as médias aritméticas das variações nas taxas dos quatro prostanóides, a seguinte classificação foi obtida, em ordem decrescente das

taxas de redução: fração remanescente (-40,08%), fração acetato de etila (-35,28%), extrato bruto (-28,98%), fração clorofórmio (-19,65%) e fração hexano (-8,56%).

3.3.5 Atividade anti-inflamatória das “Malvas” e a importância dos mediadores prostanoídes

De maneira geral, os extratos e as frações das três espécies de “Malvas” utilizadas neste trabalho apresentaram pontos em comum, no que tange as variações nas concentrações dos quatro prostanoídes avaliados. Para as três espécies, na maior parte dos tratamentos verificaram-se relações dose-resposta quando são comparados os tratamentos com 10 µg/mL e 50 µg/mL. Neste sentido, os tratamentos com a concentração maior forneceram as maiores taxas de reduções. Adicionalmente, a fração remanescente dos extratos das três espécies mostrou grande importância nas taxas de redução médias dos quatro prostanoídes avaliados. Para a *M. sylvestris* (-36,74%), *S. cordifolia* (-67,09%) e *P. graveolens* (-40,08%), as taxas de redução causadas pela fração remanescente foram maiores que as proporcionadas pelos respectivos extratos brutos. Como esta fração de extrato apresenta os compostos mais hidrofílicos presentes nos extratos vegetais, é possível que estes compostos, em maior concentração na fração remanescente, sejam os principais responsáveis pela redução na liberação dos prostanoídes pelas células. Diversos autores relacionam atividade anti-inflamatória e anti-oxidante com a presença de compostos hidrossolúveis em extratos de plantas, tais como flavonóides (ABDALLAH *et al.*, 2015) e antocianidinas (CARVALHO *et al.*, 2015), taninos (BUENO *et al.*, 2014) e alcalóides (ZHANG *et al.*, 2015). Outro ponto em comum entre os extratos das três espécies foi o fato de a fração hexano apresentar os menores índices de redução média de prostanoídes. A *M. sylvestris* foi a espécie cuja fração hexano apresentou a maior taxa de redução, a qual foi de aproximadamente 16%, e as outras duas espécies apresentaram taxas de redução inferiores a 10%. Dependendo do prostanoíde analisado, não houve sequer diferenças estatísticas significativas entre as amostras tratadas e as amostras controle (vide Tabelas dos Anexos V,

VI e VII). Estes baixos índices de redução, comparados às outras frações dos extratos, pode ser explicada pela maior hidrofobicidade dos compostos presentes e consequente baixa solubilidade que apresentam no ambiente aquoso representado pelo meio de cultivo celular onde os ensaios foram realizados. Porém, apesar do baixo desempenho da fração hexano nos ensaios realizados neste trabalho, alguns autores obtiveram sucesso em avaliações de atividade anti-inflamatória com este tipo de extrato, avaliando outras espécies de plantas medicinais (CARRETERO *et al.*, 2008; ANYASOR *et al.*, 2014).

É importante salientar que, em nenhum tratamento utilizando tanto a concentração de 10 µg/mL quanto a de 50 µg/mL, a viabilidade e proliferação celular mostraram diferenças significativas em relação ao conjunto de amostras controle (vide item 3.3.3.1). Isso se torna importante na medida em que é possível inferir que diminuições nas taxas dos prostanoídes não são advindas de reduções no número de células viáveis (ou de aumento de morte celular), e tampouco que o aumento na taxa dos prostanoídes não é relacionado ao aumento no número de células por estímulo à proliferação. Dessa forma, as variações nas concentrações dos prostanoídes que foram observadas neste trabalho podem ser relacionadas com a influência que compostos presentes nos extratos e nas frações possuem sobre a cascata de reações que levam à produção dos prostanoídes pelas células.

Comparando-se as variações nas taxas médias de liberação dos quatro prostanoídes, utilizando tratamentos com extratos brutos na concentração de 50 µg/mL, o extrato de *S. cordifolia* mostrou-se com maior capacidade de redução, com a queda média de 47,51%. Em segundo lugar, o extrato de flores de *M. sylvestris* aparece com redução de 35,84%, seguido do extrato de folhas da mesma espécie, com redução de 30,00%. Finalmente, o extrato de *P. graveolens* aparece com taxas médias de redução de 28,98%. Dessa forma, dentre as espécies de “malvas” avaliadas neste trabalho, apesar de a *M. sylvestris* (que não é nativa do Brasil) ser a única que apresenta uma monografia na Farmacopéia Brasileira e ser a “malva” recomendada pela RDC N° 10, de 9 de março de 2010, esta apresenta uma capacidade inferior em reduzir a concentração de prostanoídes, quando comparada com a *S. cordifolia*. Dessa forma, dado que a “malva-branca” é uma espécie facilmente

encontrada em diversos estados brasileiros, é importante que mais estudos acerca do seu potencial anti-inflamatório sejam realizados.

Macrófagos RAW 264.7 são considerados um modelo apropriado para mimetizar processos inflamatórios *in vitro*, pois possuem um importante papel na liberação de prostanóides e são células-chave na resolução de processos inflamatórios locais (BODET *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2009). Estas células, quando estimuladas pelo LPS (uma endotoxina derivada da membrana celular de bactérias gram-negativas) através da ligação em receptores do tipo *Toll-like 4* (TLR4), ativam diversas vias de sinalização, das quais a mais importante é a NF κ B (*Nuclear Factor kappa β*), que quando é translocada para o núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos patofisiológicos (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Estes genes, por exemplo, induzem a produção de prostanóides pró-inflamatórios acima dos níveis homeostáticos, desencadeando um processo inflamatório.

Entre estes prostanóides, merecem destaque no desenvolvimento e resolução da inflamação a PGE₂, a PGD₂, o TXB₂ e a PGF_{2 α} . Os efeitos farmacológicos destes prostanóides são mais numerosos e diversos que de quaisquer outros produtos do metabolismo do ácido araquidônico. Eles possuem um papel significativo em virtualmente todos os sistemas do organismo. Contudo, de acordo com o local de ação e em função de diversas condições fisiológicas, funções e efeitos conflitantes são muitas vezes percebidos. Exemplo desta condição pode ser visto com a PGD₂, que sistemicamente, causa tanto vasodilatação como vasoconstrição. Assim, não obstante a forte evidência de que as prostaglandinas são "pró-inflamatórias", é importante considerar as suas atividades "anti-inflamatórias" através dos mais variados mecanismos imunogênicos (MILLER, 2006).

É bem aceito e estabelecido que as prostaglandinas são capazes de provocar e induzir os sinais cardinais da inflamação calor, rubor, dor, edema e perda de função tecidual. A vasodilatação, em conjunto com o aumento da permeabilidade vascular e a febre, é responsável por estas consequências da inflamação. Tanto PGE₂ quanto PGD₂ contribuem para a ocorrência destes eventos (MILLER, 2006). A despeito de todas as funções fisiológicas onde a presença de PGE₂ é importante (proteção da mucosa gástrica, formação e

reabsorção de tecido ósseo, aumento de excreção de sais e água, participação intensa no sistema reprodutivo masculino e feminino), ela é uma das principais moléculas relacionadas à febre e a hiperalgesia (MILLER, 2006). Além disso, é bem estabelecida a relação entre o aumento de PGE_2 e a diminuição da efetividade da resposta imune (NAGAI, 2008). Existem também consideráveis evidências do envolvimento da PGD_2 na regulação de diversos processos fisiológicos e patofisiológicos, tais como indução do sono, agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso e liberação de hormônios (GAO *et al.*, 2009). A PGD_2 possui importância central na inflamação mediada por processos alérgicos, bem como a quimioatração de eosinófilos. Adicionalmente, causa o aumento de citocinas e quimiocinas relacionadas à atração de linfócitos T (NAGAI, 2008). Apesar de não ser ainda muito clara a relação entre a presença de PGD_2 e o desenvolvimento de febre, há relatos de que a diminuição de PGD_2 periférica previne o desenvolvimento de febre induzida por LPS (GAO *et al.*, 2009). O TXA_2 , produto da ação da enzima tromboxano sintase sobre o precursor comum produzido pela COX, tem um tempo de meia-vida muito curto (aproximadamente 20 segundos), sendo transformado em TXB_2 , o qual é biologicamente inativo (MILLER, 2006). O tromboxano é primariamente produzido pelas plaquetas, possuindo uma potente ação vasoconstritora e de indução da agregação plaquetária. Dessa forma, apresenta papel central na hemostase (MILLER, 2006). Além disso, apresenta potente ação como relaxante de músculo liso (NAGAI, 2008). O tromboxano não é uma prostaglandina, porém é um dos mais importantes derivados eicosanóides da COX. Muitas evidências sugerem um importante papel do tromboxano no desenvolvimento de inflamações alérgicas, principalmente causando uma potente broncoconstrição *in vivo* e *in vitro*. A presença de tromboxanos também é associada a inflamações de pele (dermatites) e das vias aéreas (NAGAI, 2008). Outra forte relação entre a presença de tromboxano e o desenvolvimento e resolução de processos inflamatórios é a sua atuação como promotor do recrutamento de macrófagos para reparo de lesões hepáticas (MINAMINO *et al.*, 2012). Em conjunto com a PGE_2 , PGD_2 e PGI_2 , a $PGF_{2\alpha}$ representa uma das principais e mais importantes prostaglandinas (MILLER, 2006). Fisiologicamente, atua como indutor de

contração de músculo liso, diminuidor de pressão intra-ocular (NAGAI, 2008), e principalmente no sistema reprodutor feminino, sendo importante durante o trabalho de parto, menstruação, fertilização e ovulação (MILLER, 2006). Em relação ao processo inflamatório, é utilizada como marcador do estresse oxidativo que leva ao desenvolvimento de diversas doenças (ERVE *et al.*; 2015), além de ser um potente vasoconstritor de veias e artérias pulmonares (MILLER, 2006). Além disso, sua secreção é desencadeada pelo influxo de neutrófilos polimorfonucleares no útero, leucócitos estes que são advindos de processos inflamatórios e infecciosos (PENROD *et al.*, 2013).

Os prostanóides avaliados neste trabalho apresentam um importante papel no desenvolvimento de inflamações. Dessa forma, a redução na concentração destes mediadores observada em cultivos de células RAW 264.7 tratadas com extratos de “malvas” pode favorecer a resolução de processos inflamatórios. Dado que existe um precursor comum que origina tanto as prostaglandinas quanto o tromboxano, é possível que os extratos de “malvas” bloqueiem um ou mais dos caminhos que o LPS utiliza para aumentar a expressão destes mediadores. Assim, apesar de as taxas de redução dos mediadores observadas neste trabalho terem sido consideradas positivas, outros estudos complementares devem ser realizados para determinar quais os mecanismos anti-inflamatórios específicos que os extratos destas plantas utilizam.

3.4 CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLAE-EM/EM mostrou ser adequado para a análise de PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ e TXB_2 extraídos de meio de cultivo celular. A coluna cromatográfica utilizada é bastante comum em laboratórios analíticos (C-18, de 4,6x50 mm, com 1,8 μm de tamanho de partícula), e o método apresentou a separação adequada entre os analitos que foram monitorados utilizando a mesma transição (resolução de 1,44), com um tempo de corrida de 4 minutos e consumindo pequeno volume de solvente orgânico. Apesar de o LTB_4 apresentar problemas com relação à linearidade e a estabilidade, os outros analitos apresentaram seletividade, efeitos residuais e de matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade aceitáveis de acordo com a RDC ANVISA N. 27, de 17 de maio de 2012.

Nenhum dos extratos brutos ou frações das três espécies de “Malvas” avaliadas, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, foram capazes de estimular a proliferação das células RAW 264.7. Porém, estes extratos brutos ou frações, em concentrações acima de 100 $\mu\text{g/mL}$, mostraram toxicidade e causaram diminuições significativas na contagem de células viáveis. Assim, as concentrações utilizadas nos tratamentos foram de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ de extratos de planta. Dos mediadores inflamatórios pesquisados, foi possível a quantificação da PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e do TXB_2 . A 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ foi detectada em concentrações inferiores ao limite de quantificação obtido durante a validação do método. Tanto o LPS (utilizado como indutor da liberação de mediadores) quanto a dexametasona (utilizada como anti-inflamatório de referência, inibidor da liberação de mediadores) funcionaram adequadamente, aumentando em no mínimo 263% e reduzindo no mínimo em 86% a taxa de mediadores liberados, respectivamente.

De maneira geral, houve relação dose-resposta no que tange a diminuição da liberação de mediadores inflamatórios liberados (comparados às amostras que receberam somente LPS), quando as células receberam tratamento com 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. Nas três espécies, os melhores resultados foram obtidos com extratos brutos e com a fração remanescente. Comparando-se as diminuições nas taxas médias de liberação dos quatro

mediadores avaliados, e considerando apenas os tratamentos com extratos brutos na concentração de 50 µg/mL, o extrato de *S. cordifolia* mostrou os melhores resultados, diminuindo em aproximadamente 47% a liberação de mediadores. Em segundo lugar, o extrato de flores de *M. sylvestris* apresentou uma média de redução de 35%, seguido do extrato de folhas desta mesma espécie, cuja redução foi de 30%. O extrato de *P. graveolens* mostrou taxas de redução em torno de 29%.

Dessa forma, apesar de a *M. sylvestris* ser a única “malva” que possui uma monografia na Farmacopéia Brasileira e seu uso ser recomendado pela RDC ANVISA N. 10, de 9 de março de 2010 (mesmo não sendo nativa do Brasil), a espécie que apresentou os melhores resultados em relação à diminuição dos mediadores inflamatórios foi a *S. cordifolia* (“malva-branca”), que é facilmente encontrada em diversos estados brasileiros. Apesar das taxas de redução de mediadores poderem ser correlacionadas com a capacidade anti-inflamatória das espécies, estudos complementares devem ser realizados para determinar os mecanismos específicos que cada espécie utiliza para desempenhar a sua atividade.

Capítulo 2

4.1 O USO DA QUIMIOMETRIA PARA CLASSIFICAÇÃO DAS “MALVAS”

A *M. sylvestris* é uma planta tradicionalmente utilizada contra infecções de boca e garganta (LOI *et al.*, 2004). Embora não seja nativa, o uso desta planta (conhecida como “malva”) no Brasil é estimulado por políticas governamentais, que incentivam o seu plantio, propaganda, comercialização e consumo (BRASIL, 2012). Além disso, os parâmetros de qualidade macro e microscópicos da “malva” estão descritos na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2000).

De acordo com a nomenclatura popular, aproximadamente 21 plantas podem ser identificadas no Brasil através do uso da palavra “malva” em seus nomes. Destacam-se entre estas a *M. sylvestris*, a *S. cordifolia* (“malva-branca”) e o *P. graveolens* (“malva-cheirosa”), todas alegando possuir propriedades anti-inflamatórias. Dessa forma, em função da similaridade dos nomes e do desconhecimento sobre características morfológicas de plantas medicinais, pacientes podem adquirir outras plantas conhecidas como “malva” que não a oficialmente recomendada *M. sylvestris*, não obtendo os efeitos terapêuticos desejados e podendo inclusive levar à piora do seu quadro clínico. Adicionalmente, estas plantas medicinais são geralmente comercializadas na forma de folhas secas rasuradas ou em pó, que complicam a avaliação morfo-anatômica e a distinção entre espécies.

Apesar das dificuldades inerentes à imprecisão e ao fato de ser uma análise subjetiva, a correta identificação macro e microscópica do material vegetal cru é um dos primeiros passos na avaliação do controle de qualidade de plantas medicinais. Juntamente com propriedades físicas e físico-químicas da planta, estas deveriam ser suficientes para diferenciação entre espécies relacionadas e/ou potenciais adulterantes (MAREE; VILJOEN, 2011). Embora a Farmacopéia Brasileira descreva um método por cromatografia em camada delgada para identificação de *M. sylvestris*, o marcador fitoquímico utilizado (malvidina 3-O-glucosídeo) se apresenta em baixa concentração nas folhas, tornando difícil a sua detecção através de uma técnica pouco sensível. Além disso, a análise é destrutiva, demorada e requer o uso de solventes orgânicos na composição da fase móvel (BRASIL, 2000).

Como alternativa no auxílio à correta identificação de plantas medicinais, podem ser utilizadas técnicas espectroscópicas tais como o infravermelho (FT-IR) que é rápido, simples, não-destrutivo e isento do uso de solventes, técnicas espectrométricas como a espectrometria de massas (ESI-MS), que fornece uma rápida caracterização de misturas complexas (MAREE; VILJOEN, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2007). Métodos baseados em espectros de FT-IR tem sido utilizados com sucesso na classificação de plantas medicinais baseada em diferenças de composição química de folhas (WU *et al.*, 2010), e métodos por ESI-MS possuem recente aplicação em rápidas determinações semi-quantitativas de metabólitos específicos em plantas medicinais (GOODACRE *et al.*, 2003). A complexidade de interpretação dos espectros obtidos por ambas as técnicas requer o uso de procedimentos quimiométricos para extrair e interpretar os dados corretamente. Neste sentido, o pré-processamento dos dados permite por exemplo aumentar a resolução e remover efeitos de linha de base dos espectros, facilitando ou tornando possível a separação de diferentes amostras de espectros de alta complexidade em grupamentos com padrões similares.

Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi utilizar perfis metabólicos espectrais para caracterizar amostras comerciais de “malva” e distinguir *M. sylvestris* de *S. cordifolia* e *P. graveolens*, utilizando espectroscopia no IV e espectrometria de massas, aliada a técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrões por método dos mínimos quadrados parciais para análise discriminante (PLS-DA). O resultado do modelo quimiométrico desenvolvido foi comparado com a análise macro e microscópica morfo-anatômica de todas as amostras, de acordo com padrões devidamente identificados das três espécies estudadas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta de material vegetal e obtenção de amostras comerciais

As três espécies utilizadas neste estudo foram coletadas em diferentes regiões do Brasil. O material foi depositado no Museu Botânico de Curitiba, para comprovar a correta identificação das espécies. Estas amostras coletadas foram utilizadas como padrão de referência para estudos morfológicos e anatômicos por microscopia, para confirmação e identificação de todas as amostras comerciais. *M. sylvestris* (exsicata número MBM384458) foi coletada em fevereiro de 2013 em Ponta Grossa – Paraná (25°05'01.24"S; 50°12'10.84" W); *S. cordifolia* (exsicata número MBM388190) foi coletada em agosto de 2013 em Dourados – Mato Grosso do Sul (22°12'04.12"S; 54°54'34.26"W) e *P. graveolens* (exsicata número MBM381610) foi coletado em Curitiba – Paraná (25°18'45.87 "S, 49°0 '29.4804" W) em Abril de 2013.

Amostras comerciais de folhas de “Malvas” envolvidas no estudo (n = 60), foram adquiridas em mercados ou ervanários de diversas regiões do Brasil, tanto na forma industrializada quando a granel. Estas amostras estavam originalmente rotuladas como: *M. sylvestris* ou “malva” (n = 49); *S. cordifolia* ou “malva-branca” (n = 7) e *P. graveolens* ou “malva-cheirosa” (n = 4). Em todos os casos, as amostras comerciais foram obtidas de diferentes fornecedores (entre 2012 e 2013), e estavam dentro do prazo de validade. Até o momento do uso, todas as amostras foram mantidas em ambiente com temperatura ($20,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45-55%) controlados, e não foi realizado nenhum procedimento adicional, a fim de evitar modificações nas características originais e composição química das folhas.

4.2.2 Preparo das amostras comerciais para análise por infravermelho e obtenção de espectros

Para a análise pelo método de infravermelho (FT-MIR) utilizando a técnica da reflectância atenuada (ATR), folhas inteiras ou fragmentos de folhas de tamanho superior a 1 cm^2 foram diretamente analisadas pelo aparelho,

utilizando módulo específico composto pelo cristal diamante para análises por ATR. O espectro FT-MIR foi adquirido entre 4000-400 cm^{-1} em um espectrômetro Alpha-P da Bruker (Bruker OPTIK GmbH, Ettlingen, Alemanha), controlado pelo software OPUS (versão 6.5). O material vegetal foi posicionado com a superfície adaxial no cristal diamante horizontal e os espectros foram obtidos no modo absorvância. Foi registrado o espectro médio de três diferentes regiões da folha (escolhidos aleatoriamente) ou de três diferentes fragmentos (quando as folhas eram pequenas). A plataforma de amostragem do equipamento foi limpa com álcool isopropílico entre as análises de cada amostra. Um total de 64 *scans* foram obtidos para cada amostra, com resolução de 4 cm^{-1} , acumulando um total de 2559 pontos de dados. Todas as análises foram realizadas a temperatura ($20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e umidade (45-55%) controladas. Um espectro branco foi obtido antes da análise de cada amostra.

4.2.3 Preparo das amostras comerciais para análise por espectrometria de massas e obtenção de espectros

As amostras comerciais trituradas em um mixer e tamisadas (tamis de tamanho de poro de 1,19 mm) foram utilizadas para o preparo de extratos. Para isso, 500 mg foram pesados e misturados com 20 mL de metanol 70%, acidificado com ácido fórmico (0,5% v/v). Esta mistura foi sonicada por 90 minutos (com troca da água do banho a cada 20 minutos para evitar aquecimento). Em seguida, as amostras foram filtradas em papel para separação da parte sólida, e o extrato foi então filtrado em membrana de PTFE de 0,22 μm de poro (Millipore®). Os extratos filtrados foram diluídos 20 vezes em metanol, e então estas soluções foram utilizadas nas análises de DIMS (infusão direta em espectrômetro de massas). Os experimentos foram conduzidos em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems modelo API 3200) equipado com uma bomba seringa (Harvard Apparatus, modelo Harvard 22 Dual) e uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). A fonte foi operada no modo positivo, mantendo a posição do capilar em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal. A bomba seringa operou em velocidade de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os parâmetros ajustados manualmente no

equipamento para estabilização do sinal foram voltagem do capilar (IS): 4500 V, potencial de entrada no cone EP: 6 eV, potencial de desagrupamento (DP): 40 eV, gás de Interface (CUR): 10 psi e gás de nebulização (GS1): 15 psi. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR e GS1 foi produzido por um gerador de nitrogênio (Peak Scientific Instruments). Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 100 a 900 Daltons (Da) acumulando 100 ciclos de 3 segundos (5 minutos). A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Analyst 1.4 (ABI/Sciex). Os espectros de massas da solução de metanol contendo 0,1% de ácido fórmico também foram adquiridos (branco), objetivando subtrair dos espectros de massas das amostras e eliminar possíveis interferentes, previamente às análises quimiométricas.

4.2.4 Análises morfo-anatômicas

Para a análise morfológica dos tricomas, estômatos e cutícula, imagens da superfície das folhas de *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens* foram obtidas através de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Phenom®, com resolução de 30 nm (FEI, Hillboro, EUA). As amostras de folhas secas foram fixadas em fita adesiva de cobre e metalizadas com ouro, em um dispositivo Balzers Union SCD 030 FL 9496 (Balzers, Liechtenstein). Para a avaliação dos tricomas e estômatos, foi empregada a terminologia proposta por outros autores (ROMITELLI, MARTINS, 2012; ALBERT, VICTORIA-FILHO, 2002).

Para a análise anatômica, foram obtidas secções transversais (15 µm) das folhas previamente incluídas em uma matriz de polietilenoglicol 1500 (PEG-1500) e seccionadas em um micrótomo rotativo (Leica Microsystem, Alemanha). O material foi corado com 1% de azul de Astra e 1% de safranina (BUKATSCH, 1972), e lâminas semi-permanentes foram montadas usando gelatina glicerizada. Fotomicrografias foram obtidas com uma câmera digital Olympus DC300 acoplada a um microscópio Olympus BX40, utilizando o software para captura de imagens CellF Image System (Olympus BioSystems, EUA). As análises anatômicas compreenderam avaliação visual qualitativa de

trícomas, mesófilo (composição do parênquima), cutículas na face abaxial e adaxial, presença e avaliação de drusas e células mucilaginosas epidérmicas.

4.2.5 Análises quimiométricas: análise exploratória por PCA e modelos de classificação por PLS-DA

As análises quimiométricas foram realizadas utilizando o pacote PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvetor Research, EUA) operado no software Matlab 7.0.1[®] (Mathworks, EUA). Para os dados de FT-MIR-ATR, a matriz X foi composta pelos valores das intensidades de absorção no espectro infravermelho de cada amostra (de 4000 a 400 cm^{-1}); para os dados de espectrometria de massas, a matriz X foi composta pela intensidade de sinal (%) de cada massa/carga do espectro (de 100 a 900 Da). O vetor resposta Y é qualitativo, sendo uma matriz *dummy*, no qual cada uma das categorias de resposta é codificada através de uma variável indicadora. Assim, a análise de PLS-DA é feita como se a matriz Y fosse uma variável contínua (WOLD *et al.*, 2001).

Antes da construção do modelo, as amostras foram divididas em conjuntos de calibração e validação, de acordo com o método DUPLEX. Para a construção do modelo, foram avaliados os seguintes parâmetros: a utilização ou não de pré-processamentos aplicados para o conjunto de dados da matriz X; validação cruzada utilizando a técnica *venetian blinds*, que avalia a capacidade preditiva do modelo; o número de variáveis latentes (VLs), que foi escolhido em função do menor erro médio de classificação da validação cruzada (RMSECV). Para a seleção do melhor modelo, foram avaliados parâmetros relacionados a *scores* e *loadings*. Em relação à análise de *scores*, foram avaliados a presença ou não de amostras anômalas (*outliers*) através da observação do gráfico de Resíduos Q *versus* Hotelling T^2 e foi verificada a melhor distribuição espacial entre as amostras (distinção entre as amostras de *M. sylvestris* das de *S. cordifolia* ou *P. graveolens*) em função das variáveis latentes utilizadas. A análise de *loadings* foi realizada em função dos resultados obtidos por *vip scores*, cujo gráfico indica as variáveis mais importantes de cada planta que foram utilizadas na discriminação entre as espécies.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Obtenção de espectros de FT-MIR por ATR

As folhas secas de amostras comerciais e dos padrões de referência foram submetidos a análise de espectroscopia vibracional pelo método da reflectância total atenuada – ATR (folhas inteiras). Os espectros individuais relativos aos padrões de cada espécie obtidos por esta técnica são mostrados nas Figuras 39, 40 e 41, respectivamente para *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens*.

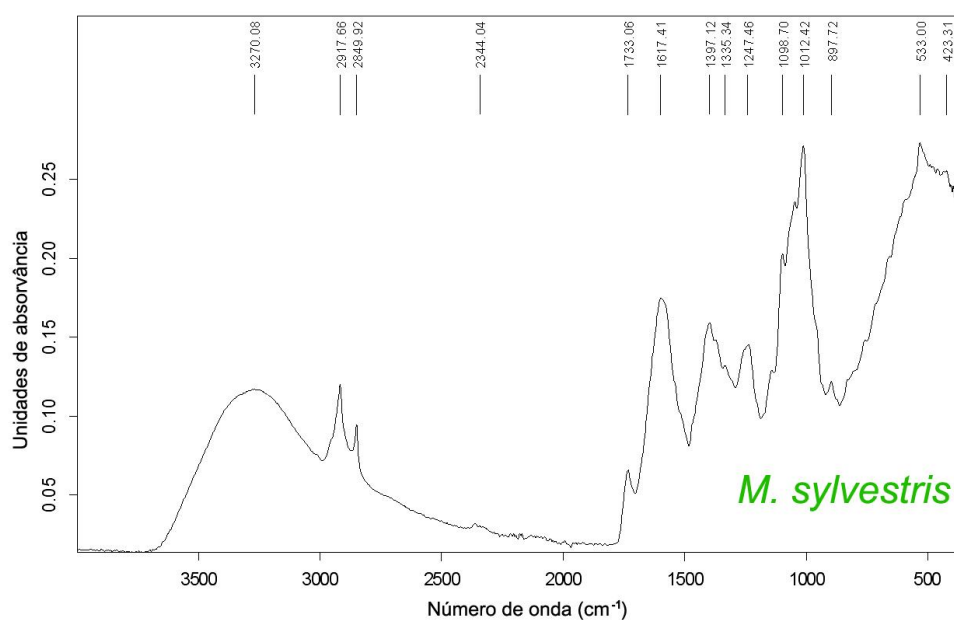


FIGURA 39 – ESPECTRO FT-MIR DAS FOLHAS DE *M. sylvestris*, OBTIDO PELO MÉTODO ATR

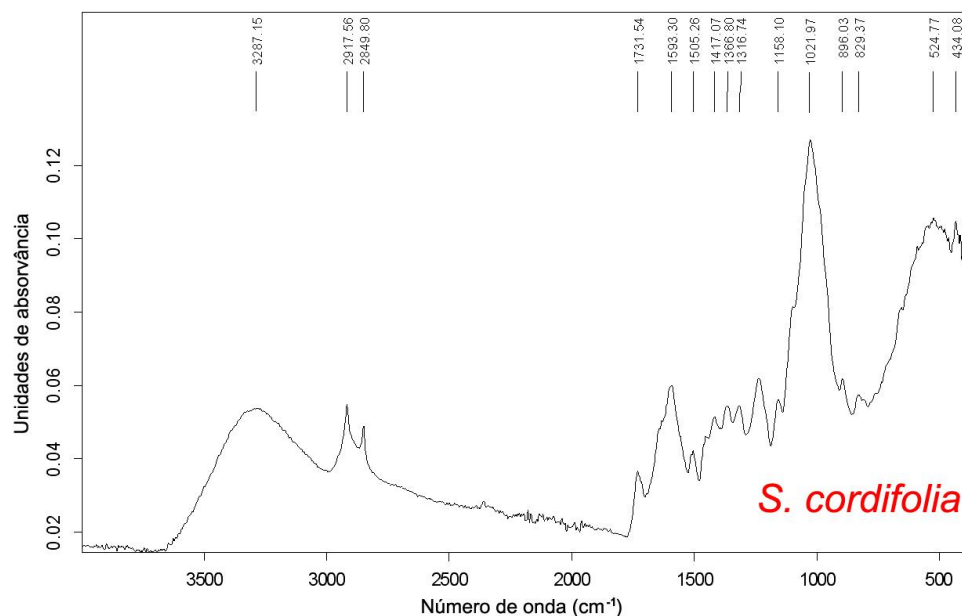


FIGURA 40 – ESPECTRO FT-MIR DAS FOLHAS DE *S. cordifolia*, OBTIDO PELO MÉTODO ATR

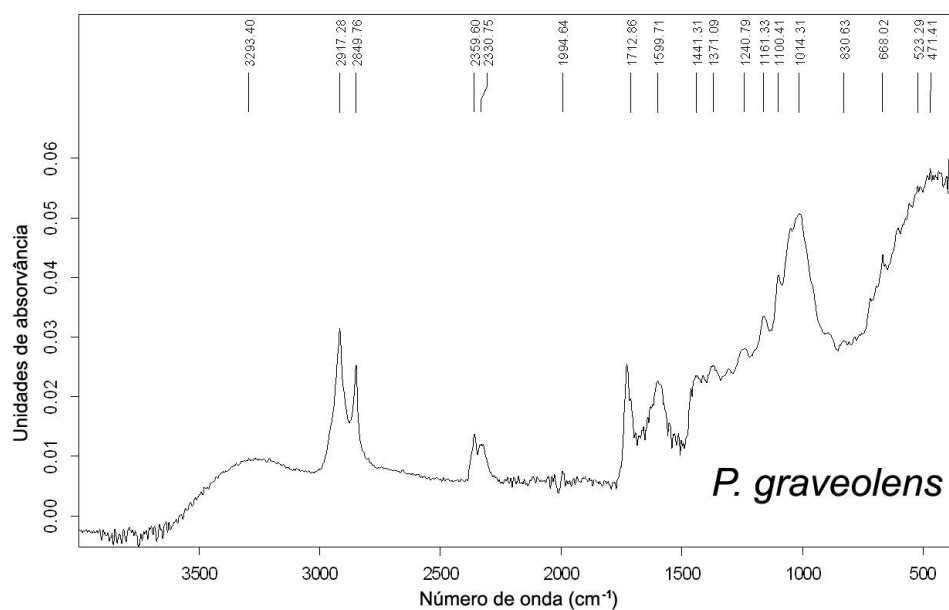


FIGURA 41 – ESPECTRO FT-MIR DAS FOLHAS DE *P. graveolens*, OBTIDO PELO MÉTODO ATR

Os espectros obtidos são semelhantes, o que pode ser corroborado pela análise da Figura 42, onde a sua sobreposição evidencia tal fato. Diferenças mais perceptíveis podem ser observadas entre 1826 cm⁻¹ e 1103 cm⁻¹, e esta região é mostrada separadamente para cada espécie.

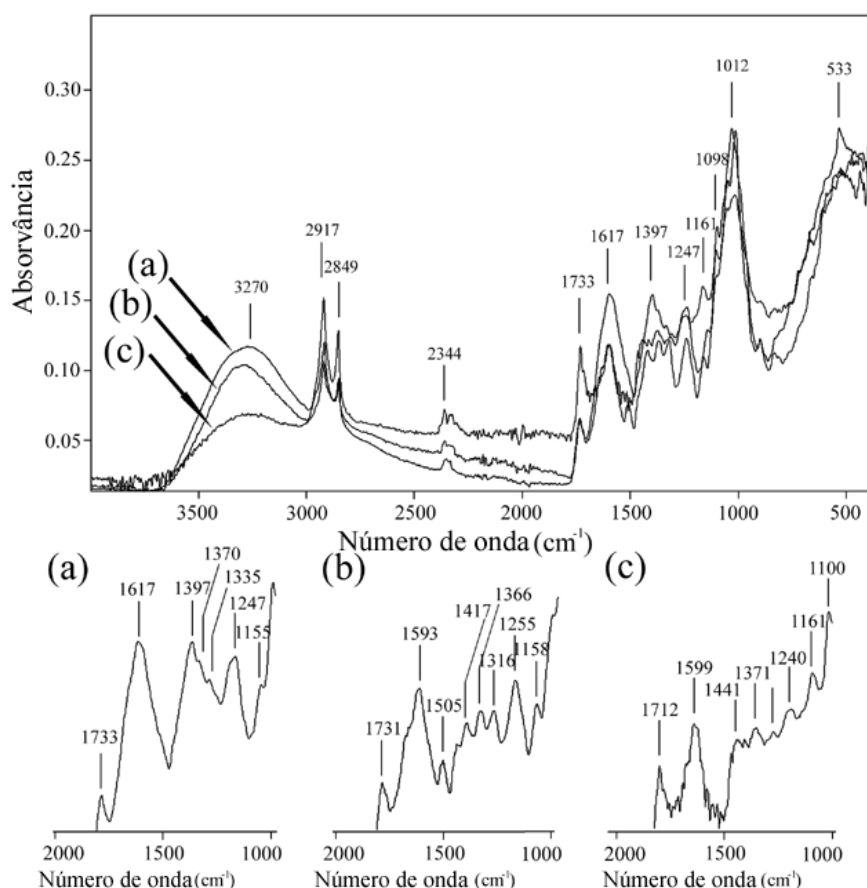


FIGURA 42 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS FT-MIR CARACTERÍSTICOS DE *M. sylvestris* (a), *S. cordifolia* (b) E *P. graveolens* (c), OBTIDOS PELO MÉTODO ATR

NOTA: O intervalo de número de onda de 1826 cm^{-1} a 1103 cm^{-1} é mostrado separadamente para cada espécie

Embora as amostras comerciais tenham sido provavelmente colhidas em diferentes épocas e estações do ano, e armazenadas sob diferentes condições, a similaridade dos espectros FT-MIR revela que elas possuem constituição química similar. Pequena diferença é percebida, especialmente entre as espécies *M. sylvestris* e *S. cordifolia*, as quais pertencem à mesma família (Malvaceae). Apesar de existirem pequenas diferenças em intensidade, posição do pico e forma das bandas, a maioria dos picos de absorvância apresentam o mesmo perfil nas três espécies, principalmente entre 4000-1800 cm^{-1} e 1100-400 cm^{-1} . Estas regiões são relacionadas às vibrações moleculares de grupos químicos muito comuns, como grupos hidroxila ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$), hidrocarbonetos saturados ($\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ a 2850 cm^{-1}) e compostos orgânicos ligados a halogênios (~ 500 a 600 cm^{-1}) (ABDULLAH *et al.*, 2012; CHOONG *et al.*, 2014).

A matriz representada pelas plantas é extremamente complexa, e dessa forma os espectros FT-MIR refletem as vibrações moleculares de vários componentes. Cada banda de absorção pode representar a sobreposição de várias bandas características de grupos funcionais presentes na amostra (WU *et al.*, 2010).

Assim, não foi o objetivo deste trabalho identificar os compostos fitoquímicos correspondentes a cada região específica do espectro, embora relações possam ser estabelecidas entre regiões de absorção e componentes comumente encontrados em plantas. Aproximadamente 12 picos de absorção foram claramente identificados nos espectros FT-MIR das três espécies, os quais puderam ser utilizados para caracterizá-las. Contudo, a região entre 1826-1103 cm^{-1} foi a mais importante e rica em informação para a discriminação das amostras (proporcionando os melhores resultados na classificação por PLS-DA). Esta região, por exemplo, inclui picos de absorção característicos dos flavonóides, representados por vibrações de alongamento dos anéis aromáticos A e B das flavonas e o grupo funcional =C-O-C do anel C das flavonas ($\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1270 \text{ cm}^{-1}$) (ABDULLAH *et al.*, 2012; CHOONG *et al.*, 2014). A Tabela 12 mostra os principais grupos funcionais possivelmente responsáveis pela discriminação entre as plantas.

TABELA 12 – PRINCIPAIS PICOS ENCONTRADOS NO INTERVALO ENTRE 1826-1103 cm^{-1} DE TRÊS ESPÉCIES DE “MALVAS” ENCONTRADAS NO BRASIL

NÚMERO DE ONDA (cm^{-1})	COMPOSTOS-CHAVE	MODOS DE VIBRAÇÃO E GRUPOS FUNCIONAIS	CORRELAÇÃO	REFERÊNCIA
1727	Anel lactona insaturado	v C=O	<i>M. sylvestris</i>	XU <i>et al.</i> , 2012
1647 e 1158	Carboidratos polimerizados	δ O-H and v C-O-C	<i>M. sylvestris</i>	XU <i>et al.</i> , 2012
1606	Aminas	δ N-H	<i>M. sylvestris</i>	MAREE; VILJOEN, 2012
1447 e 1515	Anel fenólico	v Ar	<i>S. cordifolia</i>	XU <i>et al.</i> , 2012
1396	Anel fenólico	δ C-H	<i>M. sylvestris</i>	XU <i>et al.</i> , 2012
1250	C-O-C aromático	v C-O-C	<i>S. cordifolia</i>	ABDULLAH <i>et al.</i> , 2012
1170-1190	SO ₂ simétrico	v S-O	<i>S. cordifolia</i>	ABDULLAH <i>et al.</i> , 2012
1165	=C-O-C álcoois	e v (C-O-C)	<i>M. sylvestris</i>	ABDULLAH <i>et al.</i> , 2012

NOTA: v= alongamento; δ = flexão

As três espécies mostram picos característicos na região próxima a 1720 cm^{-1} (mais intenso no *P. graveolens*) e 1600 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , estes últimos mais intensos na *M. sylvestris* e *S. cordifolia*, plantas da mesma família. A região de 1400 cm^{-1} mostra um pico único dominante para *M. sylvestris*, enquanto apresenta diversos picos de menor intensidade tanto para *S. cordifolia* quanto para *P. graveolens*. Como mostrado na Tabela 12, os picos próximos a região do 1647 cm^{-1} e 1158 cm^{-1} são consistentes com grupos relacionados a carboidratos polimerizados. De fato, as fotomicrografias indicam a presença de grandes quantidades de grânulos de amido especialmente na espécie *M. sylvestris*, a qual mostra o pico mais intenso.

4.3.1.1 Discriminação e classificação de amostras comerciais de “malvas”

A técnica de PCA (reconhecimento não-supervisionado de padrões) foi utilizada preliminarmente para identificar padrões e grupos de amostras e determinar a variação sistemática das amostras. A análise de PCA permitiu determinar as principais características dos espectros, facilitando as suas comparações e o estabelecimento de relações entre as amostras e os picos de absorvância (variáveis descritivas) (BASSBASI *et al.*, 2014). Assim, este método reduz a dimensionalidade dos dados e permite o estabelecimento de grupos dentro do conjunto de amostras.

Já a técnica de PLS-DA (reconhecimento supervisionado de padrões) foi empregada para estabelecer um modelo baseado em um conjunto de amostras de calibração, com o objetivo de classificar as amostras em espécies (ou classes) pré-definidas. Métodos baseados em PLS são chamados supervisionados uma vez que a matriz **Y** é levada em conta para a construção do modelo. Esta característica explica porque métodos baseados em PLS geralmente funcionam melhor que PCA em problemas de predição (BOULESTEIX; STRIMMER, 2007). Adicionalmente, enquanto a PCA mostra uma adequada separação entre grupos somente quando a variabilidade intra-grupo é suficientemente menor que a variabilidade inter-grupo, PLS-DA é um método que orienta uma transformação informada pela variabilidade inter-

grupos para fornecer a melhor formação de grupamentos possível (WORLEY *et al.*, 2013).

A matriz **X** (60 x 2559) representa os valores de absorção obtidos no intervalo entre 4000–400 cm^{-1} . Alguns pré-tratamentos foram testados, objetivando eliminar ou reduzir informação inútil ou redundante. Cuidado adicional foi tomado na padronização da obtenção dos espectros de todas as amostras. Regiões do limbo foliar, como nervuras e veias não foram escaneados em função da possibilidade de espalhamento físico da luz infravermelha (WU *et al.*, 2010).

Utilizando o espectro total, não foram obtidas separações satisfatórias, dada a similaridade entre os espectros das três espécies de planta. Para otimizar a separação e aumentar a previsibilidade do método, foi utilizado método de seleção variável de intervalos por mínimos quadrados parciais (iPLS). Os melhores modelos de separação e classificação foram obtidos utilizando-se o intervalo de número de onda entre 1826 e 1103 cm^{-1} , com pré-tratamento MSC e centrado na média, considerando três componentes principais (PC). Todos os valores obtidos na validação cruzada para PCA e PLS foram baixos (entre -0.001 e 0.002), e os valores de tendência (*bias*) foram próximos a zero (menores que -2.78^{-17}), indicando nenhuma tendência no conjunto de dados.

A Figura 43-a mostra o gráfico de escores da PCA. A separação entre as três espécies ocorreu ao longo das três primeiras componentes principais, as quais foram responsáveis por explicar aproximadamente 91% da variabilidade total da matriz **X** (47,41%; 37,53% e 6,85% para PC1, PC2 e PC3 respectivamente). A primeira componente principal contribuiu especialmente para a separação entre *M. sylvestris* (PC1-) e *S. cordifolia* (PC1+); a segunda componente principal contribuiu para a separação entre *M. sylvestris* e *S. cordifolia* (PC2-) e *P. graveolens* (PC2+). A proximidade entre o grupo de amostras de *M. sylvestris* e *S. cordifolia* pode ser atribuída a grande similaridade na composição química destas espécies, uma vez que ambas pertencem a família Malvaceae.

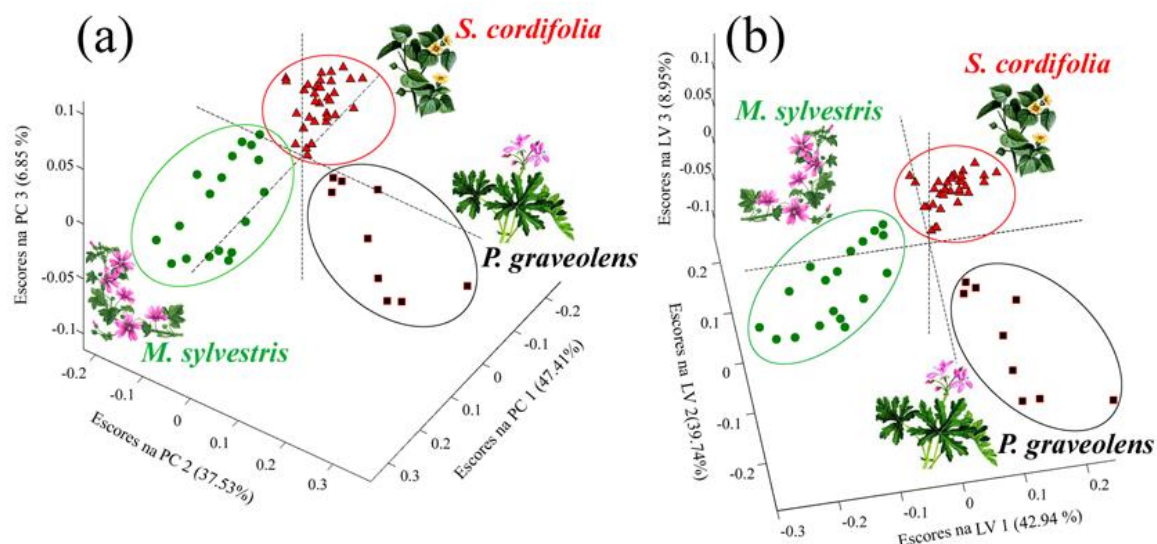


FIGURA 43 - (a) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”; (b) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”

No modelo PLS-DA (Figura 43-b), as três primeiras variáveis latentes (LV) são responsáveis por explicar 91,63% da variabilidade total da matriz **X** (LV1 42,94%; LV2 39,74% e LV3 8,95%) e aproximadamente 85% da variabilidade da matriz **Y**. Os parâmetros estatísticos utilizados para avaliar o desempenho do modelo PLS-DA na predição foram o RMSEC, RMSECV e RMSEP. Estes valores estão descritos na Tabela 13.

TABELA 13 – RESULTADOS DE RMSEC, RMSECV E RMSEP PARA O MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS FT-MIR COM NÚMERO DE ONDA ENTRE 1826 E 1103 cm^{-1} E PRÉ-PROCESSAMENTOS MSC E CENTRADO NA MÉDIA

PARÂMETROS	ESPÉCIES		
	<i>M. sylvestris</i>	<i>S. cordifolia</i>	<i>P. graveolens</i>
RMSEC	0.8196	0.9088	0.8405
RMSECV	0.7774	0.8803	0.8038
RMSEP	0.8150	0.8550	0.8023

FONTE: O autor (2014)

Para *M. sylvestris* e *P. graveolens*, os valores de coeficientes de correlação foram maiores que 0,77 e o modelo não apresentou problemas de classificação ou predição. Para estas duas espécies, o modelo apresentou uma habilidade preditiva de aproximadamente 80%. Para *S. cordifolia*, embora os

coeficientes de correlação tenham variado de 0,85 a 0,90, uma amostra foi mal classificada como descrito no item 4.3.1.2.

Como mostrado na Figura 44, todas as amostras utilizadas para a calibração e para a validação cruzada foram corretamente classificadas, isto é, os valores de sensibilidade e a especificidade foram próximos a 1,00. Assim, este modelo proporcionou taxas de 100% de predição correta no conjunto de validação da *M. sylvestris* e *P. graveolens*. Contudo, dado que existiu uma amostra má classificada da espécie *S. cordifolia*, os menores valores de sensibilidade e especificidade obtidos para a predição desta espécie proporcionaram uma taxa de predição correta de aproximadamente 91%. A classificação entre as espécies foi baseada na avaliação do valor de classe obtido pelo modelo PLS-DA e os limiares de discriminação foram determinados por estatística Bayesiana. Assim, se o valor de estimação de classe apresentou um valor maior do que o limiar de discriminação do modelo PLS-DA, a amostra foi classificada como pertencente à classe discriminada (espécie). Amostras plotadas acima da linha tracejada superior pertencem a espécie *M. sylvestris* (Figura 44-a), *S. cordifolia* (Figura 44-b) ou *P. graveolens* (Figura 44-c), enquanto amostras cujos pontos estão abaixo da linha tracejada superior pertencem a outras espécies. Os resultados classificatórios obtidos pela técnica do PLS-DA foram corroborados pelas análises morfológicas de todas as amostras.

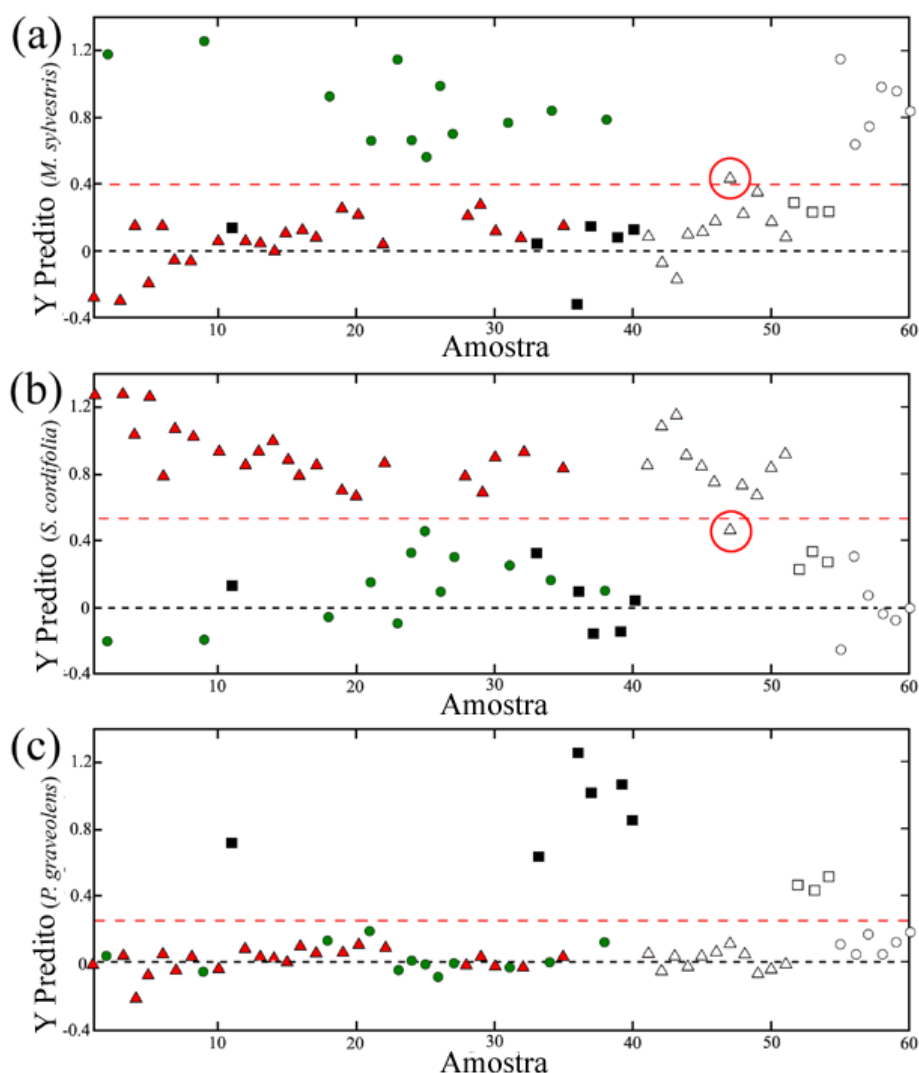


FIGURA 44 – AVALIAÇÃO DA PREDITABILIDADE DO MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS FT-MIR NA CLASSIFICAÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES DE “MALVAS”.

NOTA: (a) amostras de *Malva sylvestris* (● calibração; ○ validação), (b) *S. cordifolia* (▲ calibração; △ validação) e (c) *P. graveolens* (■ calibração; □ validação) abaixo da linha superior pontilhada são consideradas como pertencentes à determinada espécie

Adicionalmente, as mais importantes variáveis discriminatórias foram avaliadas utilizando a “Análise da Importância da Projeção de Variáveis” (escores VIPs). A avaliação dos valores de VIPs fornece a contribuição de cada variável experimental no modelo PLS-DA e permite identificar os comprimento de onda que estão mais correlacionados com as respostas ou classificações observadas. Valores de Vips maiores que 1,00 são considerados significativos (MARINI *et al.*, 2009). Os cinco valores mais altos de VIPs foram considerados como os mais relevantes para a classificação e foram utilizados como marcadores para a discriminação entre as três espécies. Os números de onda

e os valores de VIPs (entre parêntesis), foram: 1731 (4,1); 1403 (3,8); 1393 (3,7); 1717 (3,5); 1167 (3,0) para a *M. sylvestris*; 1235 (3,6); 1189 (3,5); 1393 (3,1); 1507 (3,1); 1112 (2,7) para a *S. cordifolia* e 1233 (3,3); 1189 (2,9); 1731 (2,6); 1717 (2,4); 1818 (2,3) para o *P. graveolens*. Embora alguns números de onda sejam coincidentes, na maior parte dos casos a média das intensidades de VIPs em cada grupo são diferentes. A Tabela 12 relaciona os números de onda (que são os valores VIPs) mais importantes para cada espécie.

Os resultados de sensibilidade, especificidade e erros de classificação obtidos na validação do método são mostrados na Tabela 14.

TABELA 14 – RESULTADOS OBTIDOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS DE FT-MIR

PARÂMETROS	ESPÉCIES		
	<i>M. sylvestris</i>	<i>S. cordifolia</i>	<i>P. graveolens</i>
Sensibilidade (calibração)	1,000	1,000	1,000
Especificidade (calibração)	0,952	1,000	0,987
Sensibilidade (validação cruzada)	1,000	0,980	1,000
Especificidade (validação cruzada)	0,935	1,000	0,974
Sensibilidade (predição)	1,000	1,000	1,000
Especificidade (predição)	1,000	1,000	0,962
Erro de classificação (calibração)	0,0241935	0	0,00657895
Erro de classificação (validação cruzada)	0,0322581	0,0102041	0,0131579
Erro de classificação (predição)	0	0	0,0192308

FONTE: O Autor, (2014)

Tanto a sensibilidade quando a especificidade, quando considerados os conjuntos de calibração, validação cruzada e predição, mostraram valores próximos a 1,00, que representa que o método foi sensível e específico e possui a habilidade de detectar amostras que não pertencem a uma determinada espécie. Já os erros de classificação, para todos os conjuntos de amostras, os valores aproximaram-se de zero, o que representa que o modelo classificou corretamente as amostras das três espécies em todos os conjuntos utilizados.

4.3.1.2 Uma amostra mal classificada

A identidade de todas as amostras utilizadas neste estudo foi confirmada por análises morfológicas. Contudo, entre as amostras de *S. cordifolia*

utilizadas na validação cruzada do PLS-DA, uma foi classificada como *M. sylvestris*. Na Figura 44-b, esta amostra é marcada com um círculo. Esta amostra continha uma grande quantidade de pó e folhas rasuradas em pequenos pedaços. Na análise por microscópio de varredura (Figura 45-a), inicialmente somente características morfológicas de *S. cordifolia* foram observadas (Figura 45-b). Quando a análise por PLS-DA mostrou que uma das amostras tinha sido mal classificada, uma nova população de fragmentos de folha foi escolhido e esta amostra foi reanalisada pelo microscópio eletrônico de varredura. Nesta segunda análise, alguns fragmentos com morfologia típica de *M. sylvestris* foram observados (Figura 45-c). Uma terceira análise confirmatória foi realizada, desta vez utilizando os menores fragmentos da amostra com área superior a 1 cm². Novamente foram observadas morfologias típicas das duas espécies, porém a maioria indicativa de *M. sylvestris*.

Por suas características morfoanatômicas, as folhas de *M. sylvestris* são mais facilmente cominuídas em pó, reduzindo a probabilidade de estes fragmentos serem escolhidos para a análise microscópica. Dessa forma, um fragmento de *M. sylvestris* pode ter sido escolhido para a análise por ATR, proporcionando um espectro médio característico de *M. sylvestris* para a classificação por PLS-DA. Subseqüentemente, uma nova análise por ATR foi realizada utilizando os mesmos fragmentos utilizados na análise morfológica e então a amostra foi inequivocamente classificada com *M. sylvestris*.

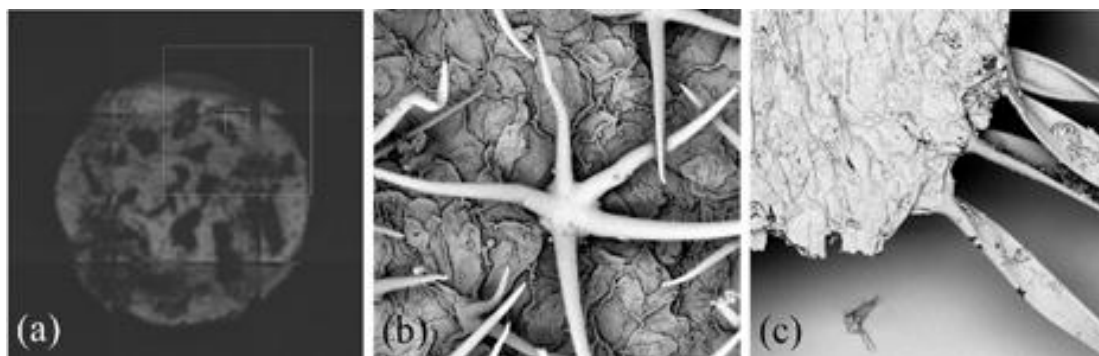


FIGURA 45 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE UMA AMOSTRA MAL CLASSIFICADA PELO MÉTODO PLS-DA

NOTA: (a) imagem dos fragmentos de uma amostra analisados por MEV; (b) alguns fragmentos desta amostra apresentam tricomas não-glandulares com 4-7 ramos, característicos de *S. cordifolia*; (c) alguns fragmentos desta amostra mostram tricomas não-glandulares com 2-4 ramos, característicos de *M. sylvestris*.

A presença de fragmentos das duas espécies em uma amostra pode ser relacionada com adulteração do produto, uma vez a *S. cordifolia* é uma planta medicinal mais barata e mais facilmente encontrada do que *M. sylvestris*. A detecção desta má classificação foi interessante e mostrou que a espectroscopia FT-MIR proporciona um perfil característico de cada espécie que pode ser utilizado no controle de qualidade de plantas medicinais. O método foi portanto sensível para detectar diferenças entre as amostras, as quais podem estar relacionadas a misturas ou adulterações.

4.3.2 Obtenção de espectros de massas

Nesta etapa do trabalho, extratos de amostras comerciais de “Malvas” foram diretamente injetadas em espectrômetro de massas (ESI-EM), e a habilidade do método analítico em distinguir *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens* utilizando um perfil metabólico não específico foi avaliado por análises quimiométricas. A análise do perfil metabólico é uma forma rápida e que fornece alta quantidade de dados para possibilitar a classificação de amostras em situações onde a quantificação e identificação de metabólitos não são empregadas (DUNN; ELLIS, 2005). Além disso, o preparo da amostra, a separação e a detecção são em geral muito rápidos e simples. A injeção direta em ESI-EM compreende todas estas características. Embora tanto os modos de ionização positiva e negativa terem sido testados, a fonte de ionização ESI foi operada somente no modo positivo pois esta forma possibilitou a ionização de um maior número de componentes. Além disso, este modo de ionização facilita a comparação dos resultados obtidos com estudos anteriores, pois o modo positivo é frequentemente utilizado em análises metabolômicas de plantas (SCHIOZER *et al.*, 2012).

Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de 100 a 900 *m/z*. Este intervalo foi utilizado por compreender as massas da maioria dos metabólitos secundários (alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos) e seus derivados presentes em plantas (PLAZONIC *et al.*, 2009; WÜST *et al.*, 1998). A Figura 46 mostra o espectro ESI-EM das três espécies de plantas, indicando as intensidades relativas (%) dos íons presentes nos extratos.

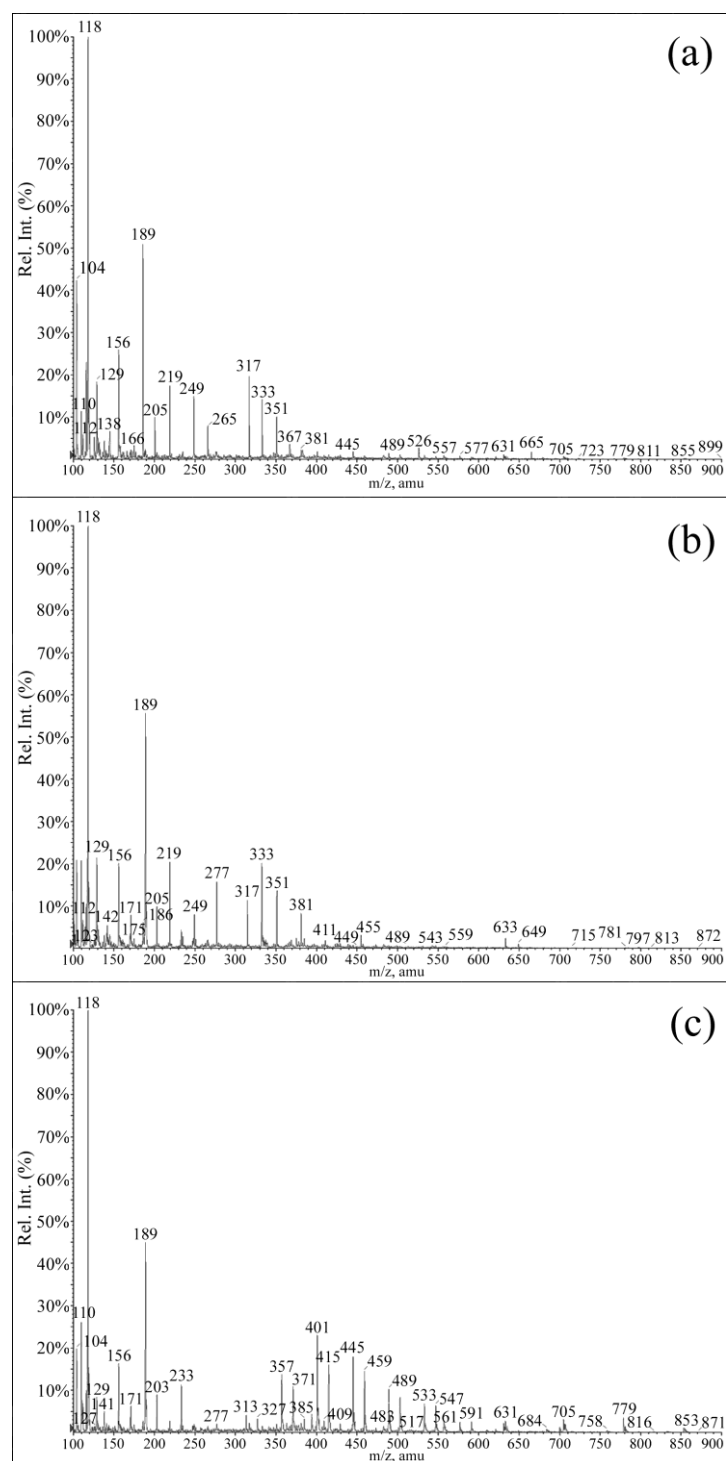


FIGURA 46 – PERFIL METABÓLICO OBTIDO POR INJEÇÃO DIRETA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE “MALVAS” EM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS NO MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO

NOTA: (a) *M. sylvestris*; (b) *S. cordifolia*; (c) *P. graveolens*

O uso de uma fonte de ionização branda do tipo eletrospray (ESI) geralmente reduz a fragmentação de moléculas antes da análise das massas. Dessa forma, um mesmo metabólito (M) pode ser representado diversas vezes

em uma lista de massas obtidas pelo modo positivo na forma de adutos tais como $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, e $[M + K]^+$. Picos de massa adicionais também podem ser resultantes da presença de espécies iônicas isobáricas isótopos atômicos (HAGEL; FACCHINI, 2008). A falta de separação cromatográfica (frequentemente associada a equipamentos de determinação de massa com alta resolução e alta exatidão) e a ausência de perfis de fragmentação obtidos por análises MS^n são fatores adicionais que complicam a detecção e caracterização de metabólitos-alvo em matrizes complexas como extratos de plantas (DUNN; ELLIS, 2005; WOLFENDER *et al.*, 2013; DETTMER *et al.*, 2007).

Alternativamente, análises podem ser realizadas utilizando espectrômetros com ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS) para reduzir os efeitos de supressão iônica que caracteristicamente ocorrem em ESI (DETTMER *et al.*, 2007). Em face a estes desafios, os perfis metabólicos baseados em EM associados a técnicas quimiométricas são emergentes métodos de análise com aplicação na determinação da composição de produtos vegetais (COMMISSO *et al.*, 2013), avaliação da segurança e qualidade de alimentos derivados de plantas (OMS-OLIU *et al.*, 2013), discriminação entre espécies e avaliação de produtos defeituosos (BASSBASI *et al.*, 2014), etc.

Embora as amostras comerciais utilizadas neste estudo tenham sido colhidas em diferentes épocas, estações do ano e mantidas sob diferentes condições de armazenamento, poucas diferenças podem ser observadas na comparação entre os seus espectros de massa, em particular entre amostras de *M. sylvestris* e *S. cordifolia*. Excluindo os íons com intensidade relativa menor do que 10% da intensidade do pico base, foi possível observar os seguintes padrões de íons (m/z): 104, 110, 118, 129, 156, 189, 219, 249, 317, 333 e 351 para *M. sylvestris*; 104, 112, 118, 129, 156, 189, 205, 219, 277, 317, 333 e 351 para *S. cordifolia*; e 104, 110, 118, 156, 189, 233, 357, 371, 401, 415, 445, 459 e 489 para *P. graveolens*.

Uma revisão de literatura revelou que diversos metabólitos já foram identificados nestas espécies de “Malvas”, dentro deste intervalo de m/z . Estes metabólitos incluem os flavonóides malvidina 3,5-diglucosídeo ($[M]^+$ m/z 655),

malvidina 3-glucosídeo ($[M]^+$ m/z 493), malvidina ($[M]^+$ m/z 331), genisteína ($[M]^+$ m/z 270), miricetina ($[M]^+$ m/z 318), delphinidina ($[M]^+$ m/z 303), apigenina ($[M]^+$ m/z 270), quercetina ($[M]^+$ m/z 302) e campferol ($[M]^+$ m/z 286); terpenóides, derivados fenólicos (derivados dos ácidos hidróxi e metoxibenzóico, ácido ferúlico), escopoletina ($[M]^+$ m/z 192), ácidos graxos e esteróis na *M. sylvestris* (GASPARETTO *et al.*, 2012) glicosídeos flavonólicos, alcalóides do tipo efedrina e pseudo-efedrina ($[M]^+$ m/z 165), alcalóides quinazolônicos como vasicina ($[M]^+$ m/z 189), vasicinol ($[M]^+$ m/z 205) e vasicinona ($[M]^+$ m/z 203) e diversos derivados de saponinas, esteróides e taninos na *S. cordifolia* (FRANZOTTI *et al.*, 2000; GASPARETTO *et al.*, 2012; FRANCO *et al.*, 2005) e flavonóis, flavonóides tais como miricetina, quercetina, kaempferol e isorhamnetina ($[M]^+$ m/z 316), carboidratos derivados da rahmnose, monoterpénos, sesquiterpénos e óleos essenciais do tipo cetronelol ($[M]^+$ m/z 156) e geraniol ($[M]^+$ m/z 154) em *P. graveolens* (BOUKHRIS *et al.*, 2013).

4.3.2.1 Discriminação e classificação de amostras comerciais de “malvas”

Inicialmente, a técnica do PCA foi empregada para avaliar a separação entre as espécies de “Malvas”, pois isto permite a determinação e a comparação das principais características dos espectros e enfatiza relações entre as variáveis descritivas (BASSBASI *et al.*, 2014). Este método reduz a dimensionalidade da matriz de dados original e permite a visualização de agrupamentos dentro de uma população com grande número de amostras (BRERETON, 2003).

As amostras foram utilizadas como variáveis para o PCA e são descritas no gráfico de escores (Figura 47-A). A matriz **X** (60 x 8000), a qual representa a intensidade relativa dos íons dentro do intervalo avaliado, foi centrada na média e a separação entre as três espécies ocorreu em função das duas primeiras componentes principais (PC). Estas, explicam juntas 75,2% da variância total da matriz **X** (60,0% para PC1 e 15,2% para PC2), e fornecem as informações mais relevantes para a separação. Embora o grau de dispersão entre as amostras reflita as diferenças entre as espécies, a proximidade entre os

grupamentos da *M. sylvestris* e da *S. cordifolia* pode ser atribuída ao fato destas duas espécies pertencerem à família Malvaceae.

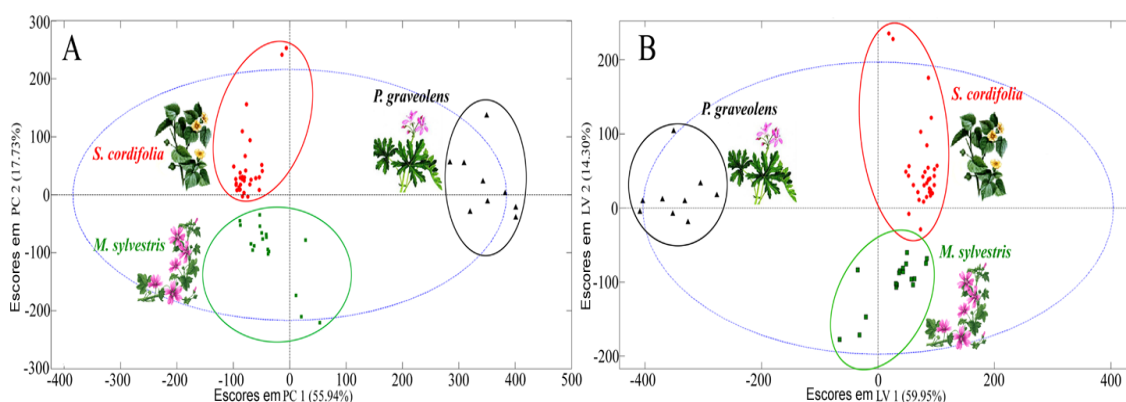


FIGURA 47 - (a) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”; (b) GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA) DE 60 AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”

Os três íons mais intensos para as duas componentes principais e seus valores de intensidade absoluta são listadas a seguir: 104,2 (0,173), 116,1 (0,135) e 120,2 (0,117) para PC1+; 118,2 (-0,153), 189,1 (-0,045) e 156,3 (-0,026) para PC1-; 189,1 (0,236), 129,0 (0,120) e 109,9 (0,116) para PC2+; e 116,1 (-0,119), 117,8 (-0,099) e 156,3 (-0,096) para PC2-. Estes íons são os mais importantes para a separação quimiométrica dentro deste conjunto de dados, e portanto podem ser utilizados como marcadores para a diferenciação entre as três espécies. De acordo com o gráfico de escores de PCA, pode ser inferido que íons com m/z de 116,1, 117,8 e 156,3 são correlacionados com *M. sylvestris*; íons com m/z de 104,2, 189, e 116,1 são correlacionados com *S. cordifolia* e íon com m/z de 118,2, 189,1 e 129,0 são correlacionados com *P. graveolens*.

Uma análise quimiométrica adicional foi realizada utilizando o método de classificação por PLS-DA. Este método identifica as variáveis latentes que permitem a melhor discriminação entre os grupamentos de amostras formados, baseando-se em seus espectros (matriz **X**) e de acordo com a máxima covariância com a classe estabelecida na matriz **Y** (BASSBASI *et al.*, 2014). Dado que a matriz **Y** é levada em conta para a construção das variáveis latentes, métodos baseados em PLS são chamados de supervisionados, em

contraste aos métodos por PCA, os quais não utilizam as informações da matriz **Y** para a construção de novas componentes. Esta característica explica porque métodos baseados em PLS geralmente funcionam melhor que métodos PCA em problemas de predição (BOULESTEIX; STRIMMER, 2007).

Diversos modelos foram testados, considerando o uso de diferentes intervalos de *m/z* e pré-processamento. O melhor modelo foi obtido utilizando todos dados de intensidade relativa (%) e pré-processamento centrado na média (Figura 47-B). Duas variáveis latentes foram escolhidas através da validação cruzada *venetion blind*, as quais explicam 74,25% da variabilidade total da matriz **X** e 78,88% da matriz **Y**. Os parâmetros estatísticos utilizados para avaliar o desempenho do modelo PLS-DA foram as raízes quadradas das médias dos erros de calibração (RMSEC), de validação cruzada (RMSECV) e predição (RMSEP). Estes valores estão descritos na Tabela 15.

TABELA 15 – RESULTADOS DE RMSEC, RMSECV E RMSEP PARA O MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS ESI-MS COM PRÉ-PROCESSAMENTO CENTRADO NA MÉDIA

PARÂMETRO	ESPÉCIES		
	<i>M. sylvestris</i>	<i>S. cordifolia</i>	<i>P. graveolens</i>
RMSEC	0,660342	0,749129	0,956958
RMSECV	0,563109	0,695255	0,931839
RMSEP	0,706742	0,800057	0,950058

FONTE: O Autor, (2014)

Para as espécies *M. sylvestris* e *S. cordifolia*, embora os coeficientes de correlação tenham variado entre 0,56 e 0,80, o modelo não apresentou problemas na classificação ou predição. A espécie *P. graveolens* apresentou os melhores resultados de coeficiente de correlação, com uma habilidade preditiva na validação cruzada maior que 93%, por exemplo.

Todas as amostras utilizadas na calibração (treinamento) e na validação (teste) foram corretamente classificadas, isto é, os valores de sensibilidade e a especificidade foram muito próximos a 1,00 (Figura 48). A classificação entre as espécies foi estimada nos valores de classe obtidos pelo modelo PLS-DA e os limiares de discriminação foram determinados baseados em estatística Bayesiana. Se o valor de classe estimado apresenta um valor maior que o limiar de discriminação do modelo, a amostra será classificada como

pertencente àquela determinada classe (espécie). Assim, amostras plotadas acima da linha pontilhada superior pertencem à espécie *M. Sylvestris* (Figura 48-A), *S. cordifolia* (Figura 48-B) e *P. graveolens* (Figura 48-C), enquanto as amostras cujos pontos são plotados abaixo da linha pontilhada superior pertencem a outras espécies. Os resultados obtidos por PLS-DA utilizando espectros ESI-MS foram corroborados pelas avaliações morfológicas (Figura 49).

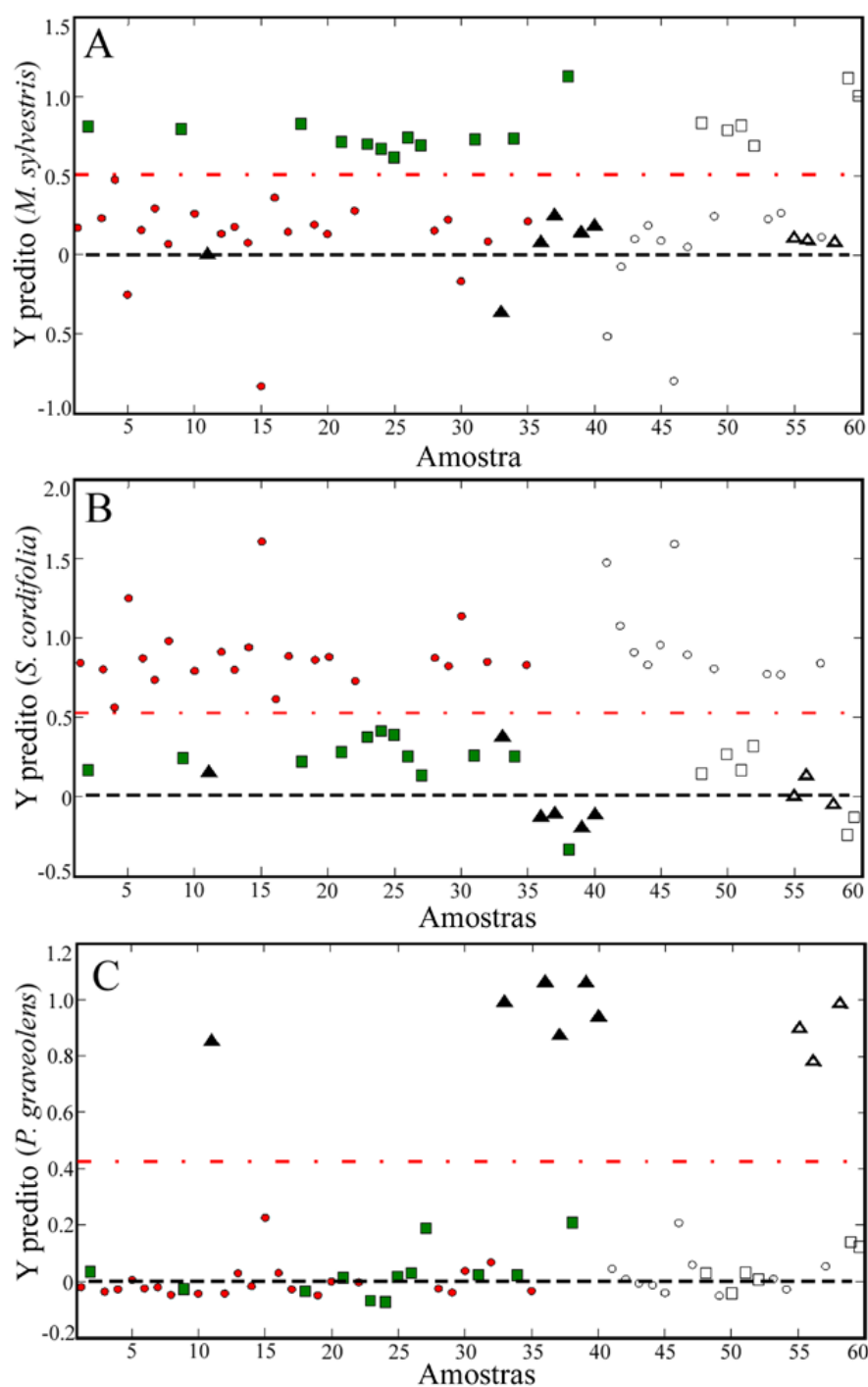


FIGURA 48 – AVALIAÇÃO DA PREDITABILIDADE DO MODELO PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS ESI-MS NA CLASSIFICAÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES DE “MALVAS”.

NOTA: (a) amostras de *Malva sylvestris* (● calibração; ○ validação), (b) *S. cordifolia* (▲ calibração; △ validação) e (c) *P. graveolens* (■ calibração; □ validação) abaixo da linha superior pontilhada são consideradas como pertencentes à determinada espécie

Os parâmetros do modelo também puderam ser utilizados para obter índices, os quais refletem a importância de cada variável preditora na definição

do modelo. Em particular, os escores VIP (Projeção da Importância das Variáveis) são uma medida da contribuição de cada variável individual na definição da matriz **X** e **Y** do modelo PLS (MARINI, 2013). As variáveis com os maiores valores de VIP foram registradas como as mais relevantes para a classificação. Os três maiores valores de intensidade de *m/z* e valores de VIP foram 189,1 (835,6), 104,2 (93,94) e 156,3 (76,29) para *M. sylvestris*; 189,1 (519,4), 104,2 (157,2) e 118,2 (93,5) para *S. cordifolia*; e 104,2 (250,6), 118,2 (191,3) e 116,1 (131,8) para *P. graveolens*.

Os resultados de sensibilidade, especificidade e erros de classificação obtidos na validação do método são mostrados na Tabela 16.

TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA UTILIZANDO ESPECTROS DE MASSAS

PARÂMETROS	ESPÉCIES		
	<i>M. sylvestris</i>	<i>S. cordifolia</i>	<i>P. graveolens</i>
Sensibilidade (calibração)	1,000	1,000	1,000
Especificidade (calibração)	1,000	1,000	1,000
Sensibilidade (validação cruzada)	1,000	1,000	0,955
Especificidade (validação cruzada)	1,000	1,000	1,000
Sensibilidade (predição)	1,000	1,000	1,000
Especificidade (predição)	1,000	1,000	1,000
Erro de classificação (calibração)	0	0	0
Erro de classificação (validação cruzada)	0	0	0,0227273
Erro de classificação (predição)	0	0	0

FONTE: O Autor, (2014)

Tanto a sensibilidade quando a especificidade, quando considerados os conjuntos de calibração, validação cruzada e predição, mostraram valores 1,00 (com exceção da sensibilidade para as amostras de validação cruzada do *P. graveolens*, que mostrou o resultado 0,955). Isto representa que o método possui ótimas sensibilidade e especificidade, sendo hábil para detectar amostras que não pertencem a uma determinada espécie. Já para os erros de classificação, para todos os conjuntos de amostras os valores foram zero ou muito próximo de zero, o que representa que o modelo classificou corretamente todas as amostras.

4.3.3 Análises morfo-anatômicas

A identidade de todas as amostras comerciais foi confirmada por análises morfológicas, comparando estas amostras com padrões de referência cuja exsicata foi depositada no herbário do Museu Botânico de Curitiba. Numa análise comparativa (Figura 49), a mais importante característica para diferenciar entre as espécies *M. sylvestris*, *S. cordifolia* e *P. graveolens* é o tipo dos tricomas. Nas três espécies ocorrem tricomas não-glandulares, que são simples no *P. graveolens* e ramificados nas outras duas espécies. As imagens obtidas por MEV mostram que a *M. sylvestris* contém tricomas não-glandulares com dois a quatro ramos, e na *S. cordifolia* aparecem tricomas que possuem de quatro a sete ramos. As fotomicrografias nas seções transversais mostram que os tricomas glandulares também exibem diferentes morfologias entre as espécies. *M. sylvestris* contém tricomas glandulares sésseis com cabeça composta por quatro células, *P. graveolens* apresenta tricomas glandulares com pescoço e cabeça unicelulares e *S. cordifolia* possui tricoma glandular sésil com cabeça constituída por uma célula.

As imagens foram utilizadas também para avaliar outras características morfológicas que são úteis na diferenciação entre as espécies. *M. sylvestris* possui uma cutícula espessa, a folha é hipoestomática e o estômato do tipo anomocítico. *S. cordifolia* tem uma cutícula lisa e plana, a folha é anfiestomática e os estômatos são anisocíticos e paracíticos. *P. graveolens* tem uma cutícula fina, e sua folha é anfiestomática, com estômatos anomocíticos. Drusas e células epidérmicas mucilaginosas são presentes em quantidades variáveis em todas as espécies.

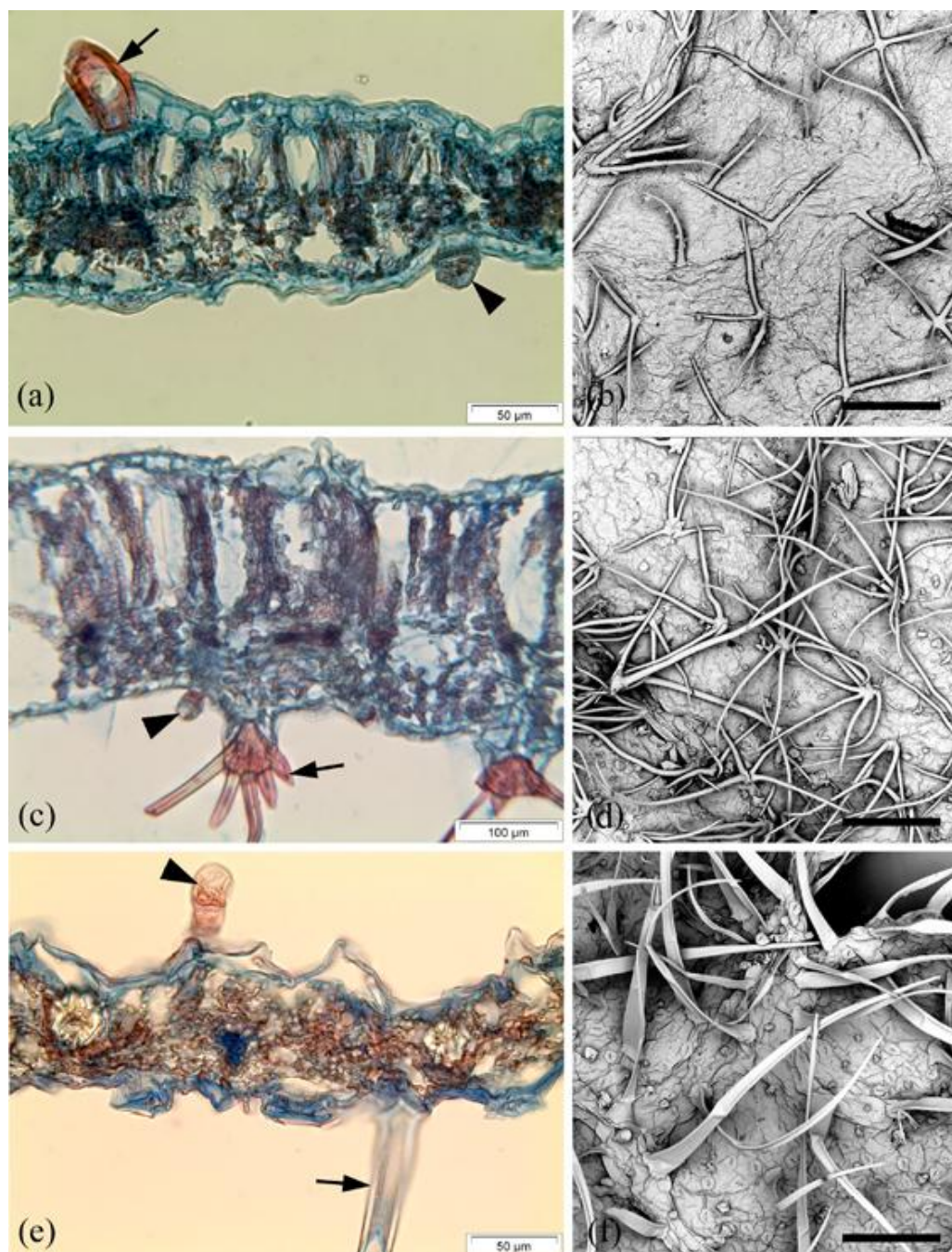


FIGURA 49 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE SEÇÕES TRANSVERSAIS E POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE AMOSTRAS DE “MALVAS”.

NOTA 1: (a) e (b) *M. sylvestris*; (c) e (d) *S. Cordifolia*; (e) e (f) *P. graveolens*.

NOTA 2: (a), (c), (e) são fotomicrografias obtidas por microscopia óptica de seções transversais de lâminas foliares. Setas indicam tricomas não-glandulares. Cabeças de setas indicam tricomas glandulares.

NOTA 3: (b), (d), (f) são fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das superfícies foliares mostrando diferentes números de ramos nos tricomas não-glandulares.

NOTA 4: a escala representa 50 μm para (a), (b), (d) e (e), e 100 μm para (c) e (f).

4.3.4 Classificação de amostras comerciais

A Tabela 17 apresenta os percentuais de amostras comerciais que foram adquiridas originalmente rotuladas como *M. sylvestris* ou “malva”, *S. cordifolia* ou “malva-branca” e *P. graveolens* ou “malva-cheirosa”, bem como os resultados de classificação obtidos por PLS-DA e confirmação morfológica por microscopia.

TABELA 17 – ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E MORFOLÓGICAS DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE “MALVAS”

AMOSTRAS COMERCIAIS ROTULADAS ^a (%)		ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E MORFOLÓGICAS (%)	
<i>M. sylvestris</i> ou “malva”	81,8	<i>M. sylvestris</i>	36,8
		<i>S. cordifolia</i>	51,0
		<i>P. graveolens</i>	12,2
<i>S. cordifolia</i> ou “malva-branca”	11,6	<i>M. sylvestris</i>	0,0
		<i>S. cordifolia</i>	100,0
		<i>P. graveolens</i>	0,0
<i>P. graveolens</i> ou “malva-cheirosa”	6,6	<i>M. sylvestris</i>	0,0
		<i>S. cordifolia</i>	25,0
		<i>P. graveolens</i>	75,0

NOTA: ^an = 60

Embora aproximadamente 82% das amostras tenham sido adquiridas como *M. sylvestris* ou “malva”, somente aproximadamente 37% das amostras de fato pertenciam a esta espécie, de acordo com as análises quimiométricas e morfológicas. Em função de ser uma espécie largamente encontrada na Europa, Ásia e norte da África (GASPARETTO *et al.*, 2012) mas não ser nativa do Brasil, a “verdadeira” *M. sylvestris* é uma espécie mais rara e mais cara que as plantas nativas. Assim, esta espécie é mais sujeita a identificação inexata, adulterações e falsificações, a despeito de ser uma espécie oficialmente recomendada pelo Sistema Único de Saúde e possuir grande demanda de consumo (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Aproximadamente metade das amostras (51%) que foram adquiridas como *M. sylvestris* na verdade pertencem a espécie *S. cordifolia*, a qual é nativa e largamente disponível em diversas regiões do Brasil. O consumo desta planta pode ser perigoso para pacientes que sofrem de doenças cardiovasculares ou problemas relacionados ao sistema nervoso central em função da presença de aminas simpatomiméticas (como efedrina e pseudoefedrina) e alcalóides com efeitos cardiovasculares (como vasicina e

vasicinol) (MARCHEI *et al.*, 2006; KHURANA; GAJBHIYE, 2013). Todas as amostras rotuladas como *S. cordifolia* ou “malva-branca” foram corretamente classificadas através das análises quimiométricas e morfológicas. Esta planta tem sido utilizada por mais de 100 anos na medicina popular brasileira (BREITBACH *et al.*, 2013), e o conhecimento sobre sua morfologia e efeitos terapêuticos são bem estabelecidos.

Falhas na rotulagem foram também observadas em amostras de *P. graveolens*, onde 25% foram classificadas como *S. cordifolia*. Embora existam poucos estudos focando o uso medicinal do *P. graveolens* no Brasil, esta planta é utilizada para tratar distúrbios inflamatórios de estômago e bexiga, predominantemente na região sul do país (DE SOUZA *et al.*, 2004).

4.4 CONCLUSÃO

Tanto os perfis metabólicos obtidos por espectrometria de massas quanto os obtidos por espectroscopia no infravermelho mostraram potencial como métodos de discriminação e classificação entre as três principais espécies conhecidas como “Malvas” no Brasil. Quando os dados espectrais de um conjunto de 60 amostras comerciais destas espécies foram combinados com métodos de reconhecimento supervisionado de padrões baseados em PLS-DA, foi possível identificar similaridades entre as amostras e a formação de agrupamentos de amostras de mesma espécie. O modelo foi considerado confiável, pois todas as amostras comerciais foram identificadas através de análises microscópicas morfo-anatômicas, que confirmaram a espécie que foi classificada pelo modelo. Assim, o uso de perfis metabólicos espectrais em conjunto com a quimiometria pode auxiliar a morfoanatomia clássica na classificação e distinção de espécies. Além disso, os dados espectrais são fáceis, rápidos e baratos de serem obtidos, confiáveis e reproduzíveis, com mínima geração de resíduos e demandam equipamentos que ocupam pouco espaço.

As avaliações quimiométricas e morfológicas das identidades das amostras comerciais mostraram que apesar de quase 80% terem sido rotuladas como *M. sylvestris* ou “malva”, somente 37% destas de fato pertenciam a espécie *M. sylvestris*. Metade destas amostras pertencia na verdade à espécie *S. cordifolia* (“malva-branca”), cujo consumo pode ser perigoso devido a presença de compostos que podem afetar o sistema nervoso e cardiovascular, como efedrina e pseudo-efedrina. Dessa forma, apesar de a *M. sylvestris* ser a única das espécies avaliadas a possuir uma monografia na Farmacopéia Brasileira e ter o seu consumo estimulado pelo SUS (RDC ANVISA N. 10, de 9 de março de 2010), falhas de identificação e rotulagem (intencionais ou não) podem comprometer a eficácia do tratamento baseado em seu uso.

Capítulo 3

5.1 O USO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA QUANTIFICAÇÕES EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *M. sylvestris*

Uma das formas de avaliar a qualidade de produtos naturais, especialmente plantas medicinais, é a detecção e quantificação de marcadores fitoquímicos. Esta avaliação muitas vezes se torna difícil em função de que extratos de plantas são misturas complexas e podem conter até milhares de constituintes diferentes (SOARES *et al.*, 2011). De especial importância na identificação de espécies, os metabolitos secundários (classificados em terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos) possuem diversas funções importantes para o vegetal, conferindo cor e fragrância para as flores, sabor, resistência contra doenças, atividade antioxidante, ferormônios, etc (GARCIA *et al.*, 2010).

Para atingir o objetivo de um maior rendimento de extração de metabolitos secundários, podem ser utilizados ao invés de solventes puros (que muitas vezes falham no seu objetivo), misturas de solventes binárias, terciárias e até mesmo quaternárias. Estas misturas englobam solventes de diferentes polaridades, sendo que as interações solvente-solvente podem muitas vezes favorecer a solvatação de determinados solutos, favorecendo a extração. Neste contexto, para a extração de compostos fenólicos de plantas, são utilizados por exemplo solventes como água, metanol, etanol, acetona, acetato de etila e suas misturas (GARCIA *et al.*, 2010). Dessa forma, como metabolitos secundários em geral ocorrem em baixas concentrações, a escolha do conjunto de solventes ideal afeta o rendimento da extração (LONNI *et al.*, 2012).

A otimização das misturas de solventes para extração de metabolitos secundários pode ser obtida com o auxílio de planejamentos experimentais do tipo “desenhos de misturas”, que são utilizados para mostrar a relação entre as diferentes variáveis (solventes). Um tipo de desenho de mistura é o Centróide Simplex, que é construído na forma de um triângulo com solventes puros localizados nos vértices, misturas binárias localizadas nos lados e misturas terciárias localizadas no interior. Dessa forma, é possível visualizar

graficamente, a significância das interações entre os solventes em questão (SOARES *et al.*, 2011).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (quarta edição, parte II do primeiro fascículo), o marcador fitoquímico utilizado para a identificação da espécie *M. sylvestris* é a “malvidina monoglicosídeo” (malvidina-3-O-glucosídeo ou oenina). Este marcador deve ser extraído das folhas da planta, utilizando como solvente uma solução de metanol com ácido clorídrico, e identificado através de cromatografia em camada delgada (BRASIL, 2000). Apesar de simples, esta técnica pode não ser adequada para a detecção do marcador da *M. sylvestris*, tanto em função da baixa sensibilidade fornecida pela cromatografia em camada delgada quanto pela inadequação do solvente extrator utilizado. Assim, é possível aplicar um desenho de misturas do tipo simplex centróide na composição dos solventes extratores, tanto para otimizar a extração de oenina quanto para avaliar outros parâmetros de atividade biológica do extrato que podem ser influenciados pela composição de solventes, como a concentração de compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes.

O objetivo deste capítulo foi utilizar um planejamento experimental do tipo Centróide Simplex para otimizar a extração de compostos fenólicos e antioxidantes de folhas de *M. sylvestris* e avaliar a presença de compostos do grupo das malvidinas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal e obtenção dos extratos

M. sylvestris, coletada em fevereiro de 2013 em Ponta Grossa-PR (25° 05'01.24"S; 50°12'10.84"W) foi depositada no Museu Botânico de Curitiba sob o número de exsicata 384458. Aproximadamente 2 kg de folhas secas foram cominuídas em moinho triturador (A11 Basic Mill, IKA®, Alemanha). Em seguida, o material triturado foi tamisado em peneira granulométrica de 150 mesh de tamanho de poro, e então o pó foi armazenado em recipiente de vidro opaco, em local seco e ao abrigo da luz, com temperatura controlada entre 22,0 e 25,0°C.

A extração foi realizada utilizando os solventes água, metanol, etanol, acetona e suas misturas, de acordo com o planejamento experimental do tipo Centróide Simplex (Figura 50), sendo obtidos 19 extratos, de acordo com a Tabela 18 (do 15º ao 19º extrato foram realizadas repetições da composição de solventes que representa o ponto central do planejamento). Todos os solventes utilizados continham 10% em volume de uma solução de ácido clorídrico a 25%, como recomenda a farmacopéia brasileira (BRASIL, 2000).

TABELA 18 – COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES UTILIZADOS PARA A ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO CENTRÓIDE SIMPLEX

EXTRATOS	SOLVENTES OU MISTURAS DE SOLVENTES UTILIZADAS (% em volume)
1	Água (100%)
2	Metanol (100%)
3	Etanol (100%)
4	Acetona (100%)
5	Água/metanol (50%/50%)
6	Água:acetona (50%/50%)
7	Água:etanol (50%/50%)
8	Metanol:acetona (50%/50%)
9	Metanol:etanol (50%/50%)
10	Etanol:acetona (50%/50%)
11	Água:metanol:acetona (33,3%/33,3%/33,3%)
12	Água:metanol:etanol (33,3%/33,3%/33,3%)
13	Água:etanol:acetona (33,3%/33,3%/33,3%)
14	Metanol:etanol:acetona (33,3%/33,3%/33,3%)
15	Água:metanol:etanol:acetona (25%/25%/25%25%)
16	Água:metanol:etanol:acetona (25%/25%/25%25%)
17	Água:metanol:etanol:acetona (25%/25%/25%25%)
18	Água:metanol:etanol:acetona (25%/25%/25%25%)
19	Água:metanol:etanol:acetona (25%/25%/25%25%)

FONTE: O Autor, (2013)

Cada extração foi realizada utilizando 20,0 gramas de pó, misturado com 250 mL dos solventes extratores (relação 1:12,5 p/v). O sistema permaneceu por 30 minutos em banho de ultrassom, com a troca da água do banho a cada 10 minutos para evitar aquecimento. Este procedimento foi realizado cinco vezes, e ao final do processo, todo o volume de extrato (aproximadamente 1250 mL) foi reunido e filtrado em filtro de papel de filtro quantitativo de poro de 28 μm . Os extratos foram então submetidos ao rotaevaporador sob pressão reduzida, controlando-se a temperatura de tal forma que não fosse superior a 60°C. Após a concentração dos extratos, o material foi congelado sob temperatura de -80°C, e posteriormente liofilizado (VIRTIS®, SP Scientific, EUA). A avaliação percentual do rendimento de cada extrato foi realizada através da razão entre o peso de extrato liofilizado obtido e o peso de pó de planta utilizado, multiplicado por 100. Os extratos liofilizados foram mantidos em recipiente fechado e opaco e armazenados em refrigerador (-80°C) até o momento do uso. Os rendimentos dos extratos (em %) foram calculados em função da massa de extrato liofilizado obtido em relação à massa de folhas secas utilizadas para a extração.

Para os ensaios cromatográficos de quantificação de malvidinas, foi adicionalmente produzido um extrato das flores de *M. sylvestris*. A extração foi realizada utilizando 5 gramas de pó de flores com 62,5 mL de uma solução composta por 10% de ácido clorídrico a 25% em metanol (relação 1:12,5 p/v). O processo de extração seguiu o mesmo procedimento adotado para as folhas, sendo ao final obtido o extrato liofilizado de flores o qual foi armazenado em refrigerador (-80°C) até o momento do uso.

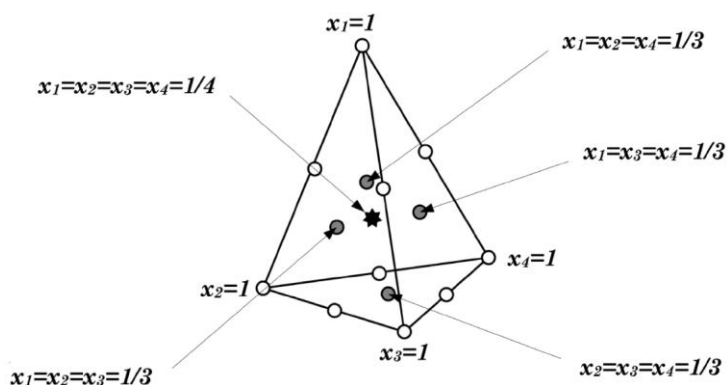


FIGURA 50 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO CENTRÓIDE SIMPLEX UTILIZADO PARA OTIMIZAR AS EXTRAÇÕES

NOTA: x_1 , x_2 , x_3 e x_4 representam as proporções de água, metanol, etanol e acetona, respectivamente

FONTE: Retirado de (SOARES; BRUNS; SCARMÍNIO; 2007)

5.2.2 Avaliação de polifenóis (fenólicos totais)

O doseamento de polifenóis foi realizado utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Cada extrato foi dissolvido, em quintuplicata, no mesmo solvente ou mistura de solventes que foi utilizado na extração (Tabela 18), a uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida, estas soluções foram filtradas em filtro de 0,22 μm de poro (Millipore®).

A concentração de polifenóis nas amostras foi avaliada a partir de 320 μL de uma solução de amostra a 80 $\mu\text{g/mL}$ (diluídas no mesmo solvente de extração), com agitação constante e adição de 400 μL de carbonato de cálcio 10%, 200 μL de reagente de Folin-Ciocalteu e 3080 μL de água. Para cada uma das amostras foi produzido o branco correspondente, utilizando o solvente ou a mistura de solventes em questão. Após 30 minutos, a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu®, Japão), em 760 nm. Foi construída uma curva analítica com 7 pontos utilizando ácido gálico como padrão, abrangendo as concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$, a qual foi utilizada para o cálculo da concentração de polifenóis em miligramas por grama de material vegetal seco.

5.2.3 Avaliação de atividade antioxidante

5.2.3.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

Cada extrato foi dissolvido, em triplicata, no mesmo solvente ou mistura de solventes que foi utilizado na extração (Tabela 18), a uma concentração de 200 µg/mL. Em seguida, estas soluções foram filtradas em filtro de 0,22 µm de poro (Millipore®). O ensaio de atividade antioxidante foi avaliado a partir da mistura de 300 µL de uma solução de amostra e de 3000 µL de solução reagente do complexo de fosfomolibdênio (28% v/v Na₃PO₄ 0,1 mol/L; 12% v/v (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 0,03 mol/L e 20% v/v de solução de H₂SO₄ 3 mol/L), em tubos de vidro com tampa de borracha. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 95°C por 90 minutos, e após resfriamento, procedeu-se a leitura a 695 nm, (espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu®, Japão), para obtenção das absorvâncias, usando-se os solventes ou misturas de solventes de cada amostra como branco. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação ao padrão rutina (200 µg/mL, dissolvido em metanol), cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1,00. Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa AAR% (rutina), com cálculo estabelecido por meio da Equação 9:

$$\text{AAR\% (rutina)} = \frac{(\text{absorvância da amostra}) - (\text{absorvância do branco})}{(\text{absorvância da rutina}) - (\text{absorvância do branco})} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

5.2.3.2 Ensaio da redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Cada extrato foi dissolvido, em triplicata, no mesmo solvente ou mistura de solventes que foi utilizado na extração (Tabela 18), sendo obtidas soluções nas concentrações de 10, 25, 50, 125, 250 e 500 µg/mL. Em seguida, estas soluções foram filtradas em filtro de 0,22 µm de poro (Millipore®), e 2,5 mL das soluções foram misturadas com 1 mL de solução etanólica de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil - 0,3 mM). A solução controle foi formada apenas pela mistura do solvente ou mistura de solventes utilizados na extração (1 mL) com as soluções obtidas (2,5 mL), de modo que para cada concentração exista um branco correspondente. Após o tempo de reação (30 minutos, a temperatura de 25°C), as absorvâncias das amostras foram determinadas a 518 nm em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu®, Japão) e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (IC%). Os resultados obtidos foram

comparados com o padrão de ácido ascórbico. A expressão dos resultados foi dada pela IC_{50} (em $\mu\text{g/mL}$), calculada com auxílio da equação da reta interpolada com os dados de concentração (eixo das abcissas) e IC_{50} (eixo das ordenadas). O solvente ou a mistura de solventes utilizada na extração foram utilizados como branco (MENSOR *et al.*, 2001).

5.2.4 Obtenção de modelos de superfícies de resposta dos resultados da avaliação de teor de polifenóis e atividade antioxidante

Modelos de superfícies de resposta utilizando como parâmetro os resultados da avaliação do teor de polifenóis e atividade antioxidante foram calculados através do software Statistica 8.0 (Statsoft Inc. 2007). O planejamento fatorial foi realizado utilizando como variáveis os solventes ou proporções de misturas de solventes utilizados na extração. O delineamento fatorial foi realizado para 4 variáveis dependentes (água, metanol, etanol e acetona), cujos valores codificados das proporções das misturas (em valores percentuais) são apresentados na Tabela 19.

TABELA 19 – PROPORÇÕES DE SOLVENTES UTILIZADOS DURANTE O PLANEJAMENTO DE EXTRAÇÕES

EXPERIMENTOS	CODIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES DA MISTURA			
	Proporção de água	Proporção de metanol	Proporção de etanol	Proporção de acetona
1	1,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	1,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	1,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	1,00
5	0,50	0,50	0,00	0,00
6	0,50	0,00	0,50	0,00
7	0,50	0,00	0,00	0,50
8	0,00	0,50	0,50	0,00
9	0,00	0,50	0,00	0,50
10	0,00	0,00	0,50	0,50
11	0,33	0,33	0,33	0,00
12	0,33	0,33	0,00	0,33
13	0,33	0,00	0,33	0,33
14	0,00	0,33	0,33	0,33
15	0,25	0,25	0,25	0,25
16	0,25	0,25	0,25	0,25
17	0,25	0,25	0,25	0,25
18	0,25	0,25	0,25	0,25
19	0,25	0,25	0,25	0,25

FONTE: O Autor, (2013)

O planejamento foi desenvolvido em triplicata ou quintuplicata, dependendo do parâmetro a ser avaliado, sendo composto por 19 experimentos (4 extrações com solventes puros; 6 misturas binárias; 3 misturas terciárias; 1 mistura quaternária, sendo esta repetida 5 vezes). O tipo de planejamento utilizado para o desenho das misturas e obtenção das superfícies de resposta foi o Centróide Simplex, sendo avaliada a adequação de modelos lineares, quadráticos e cúbicos especiais. De acordo com o modelo utilizado, a avaliação estatística foi realizada de acordo com as tabelas de ANOVA para valores p do modelo e da falta de ajuste. Foram obtidas também as estimativas dos coeficientes da equação (bem como os limites de confiança para $\pm 95\%$) para cada parâmetro. Diagramas de Pareto foram utilizados para facilitar a visualização dos efeitos principais e suas interações. Superfícies de resposta foram obtidas para aqueles parâmetros que obtiveram modelos significativos ($p \leq 0,05$) e falta de ajuste não significativos ($p \geq 0,05$).

5.2.5 Desenvolvimento de método por CLAE/EM-EM para detecção de malvidinas

5.2.5.1 Instrumentação

O cromatógrafo líquido utilizado nas análises foi um modelo Agilent® Technologies 1200 Series, com bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B e forno de coluna TCC SL G1316B. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da Applied Biosystems® modelo API 3200, utilizando fonte de ionização do tipo *Eletrospray* (ESI). O injetor automático e gerenciador de amostras utilizado foi o modelo CTC Waters® 2777 Sample Manager, e os dados obtidos pelo CLAE-EM/EM foram processados através do *software* Analyst®, versão 1.4.2.

5.2.5.2 Preparo de amostras e de padrões de malvidinas

Cada extrato de folhas foi dissolvido no mesmo solvente ou mistura de solventes que foi utilizado na extração (Tabela 18), a uma concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$; o extrato de flores foi dissolvido em metanol a uma concentração de

100 ng/mL. Em seguida, estas soluções foram filtradas em filtro de 0,22 µm de poro (Millipore®).

Foram adquiridos padrões de oenina (malvidina 3-glucosídeo, lote BCBC4154), malvina (malvidina 3,5-diglucosídeo, lote BCB67747V) e malvidina (malvidina aglicona, lote BCBC2091V), todas da Sigma Aldrich®. Estes padrões foram ressuspensos em metanol, a 1 mg/mL, e armazenados a -80°C até o momento do uso. Soluções de trabalho com a mistura das três malvidinas foram elaboradas a 500 ng/mL de cada composto, diluídas em acetonitrila/água (50:50 v/v), com 1% de ácido fórmico (v/v).

5.2.5.3 Condições espectrométricas e cromatográficas do método de detecção de malvidinas

A primeira etapa do desenvolvimento do método cromatográfico para avaliação de malvidinas foi a checagem do sinal dos analitos, realizada através da técnica da infusão direta (DIMS). Foi preparada uma solução contendo a mistura dos três padrões de malvidinas, cada um na concentração de 100 ng/mL de cada, diluídos em acetonitrila/água (50:50 v/v). Esta concentração foi suficiente para obter-se uma intensidade de sinal com valores próximos entre 2×10^5 e 1×10^6 cps (contagens por segundo), preconizada pelo fabricante do equipamento como sendo suficiente para que seja possível a posterior otimização automática dos parâmetros de detecção. Durante a realização da infusão direta, a posição do capilar vertical do ESI foi mantido em 10 mm e do horizontal em 5 mm. As amostras então foram infundidas no EM utilizando uma seringa (Hamilton®, Reno, NV-USA), mantendo um fluxo de alimentação de 10 µL/min. O monitoramento das malvidinas foi realizado no modo positivo, em função das suas características estruturais e de ionização.

Dado que a concentração utilizada na infusão se adequou às características do equipamento, foi então realizada a otimização automática (através do método Monitoramento de reações múltiplas - MRM) dos parâmetros de DP (*potencial de desagregação*), EP (*potencial de entrada*), CEP (*potencial de entrada na célula de colisão*), CE (*energia de colisão*) e CXP (*potencial da célula de saída*) do analisador de massas do equipamento. Um

ajuste fino de cada parâmetro foi realizado automaticamente para cada composto, e ao final deste procedimento foi obtido um relatório contendo todos os valores otimizados. Após a otimização por MRM, foram obtidos os espectros do íons moleculares $[M-H]^+$ de todos os compostos, bem como seus fragmentos (íons-filhos). Foram então escolhidos para o monitoramento no espectrômetro de massas os dois fragmentos mais intensos (estáveis) relativos a cada malvidina.

Após o ajuste dos parâmetros do analisador de massas, foram então otimizados os parâmetros da fonte de ionização. Para isto foi realizada uma Análise por Injeção em Fluxo (FIA), que ajustou CUR (*gás de cortina*), CAD (*gás de colisão*), GS1 (*gás nebulizador*), GS2 (*gás secante*), IS (*voltagem do capilar*) e TEM (*temperatura da fonte*). Este experimento foi realizado acoplando-se o cromatógrafo líquido, sem a coluna cromatográfica, ao espectrômetro de massas. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (50:50 v/v), com fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e volume de injeção de 10 μL . A posição vertical do capilar do *Eletrospray* foi ajustada para 3 mm, e a horizontal para 5 mm.

Com os parâmetros espectrométricos ajustados, foi realizada a otimização do método cromatográfico. O desenvolvimento do método cromatográfico foi inicialmente baseado em estudos prévios disponíveis na literatura (WILLEMSE *et al.*, 2013), utilizando a mistura de padrões a uma concentração de 100 ng/mL de cada malvidina. Em função das características moleculares dos analitos e da análise da literatura, optou-se pela utilização de coluna cromatográfica do tipo HILIC (XBridgeTM Amide, 3,5 μm , 4,6x250 mm, Waters[®] Corporation, EUA). Ajustes no sistema cromatográfico, como variações no fluxo (de 200 a 450 $\mu\text{L}/\text{min}$), composição (diferentes proporções de água em acetonitrila, variando de 90% a 50%) e modo de eluição da fase móvel (isocrática ou por gradiente) também foram avaliadas. Além disso, a necessidade do uso de aditivo na fase móvel (ácido fórmico) também foi considerada. Em todas as condições, o volume de injeção foi mantido em 20 μL , e a temperatura do forno da coluna em 50°C. Foram escolhidos os parâmetros que forneceram o melhor sistema cromatográfico, considerando o adequado perfil dos picos, a maior intensidade do sinal gerado e o menor tempo de corrida possível.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Modelos de superfícies de resposta baseados nos resultados de quantificação de polifenóis e atividade anti-oxidante

A Tabela 20 mostra o efeito dos solventes (ou do conjunto de solventes) no rendimento dos extratos (em % p/p), na quantificação de polifenóis e na avaliação da atividade antioxidante (através do IC₅₀ e do % de rutina) das folhas de *M. sylvestris*. Com exceção do rendimento, todos os resultados são mostrados na forma de média \pm DP.

Com relação ao rendimento dos extratos, de forma geral, foi possível perceber um rendimento de massa extraída superior a 36% quando solventes de maior polaridade (água e metanol) são utilizados, tanto isoladamente quanto em associação binária. Isto pode ser explicado pela alta taxa de compostos polares derivados de carboidratos (mucilagens) presentes nesta espécie, sendo que alguns autores relatam a presença de até 7,2% em peso de mucilagens nas folhas da *M. sylvestris* (GASPARETTO *et al.* 2012).

Os solventes de menor polaridade (etanol e acetona), quando utilizados isoladamente, fornecem rendimentos próximos a 20%. Etanol e acetona somente extraem massa com rendimento próximo a 30% quando em associações, não sendo expressivas as diferenças quando estas associações são binárias, terciárias ou quaternária.

TABELA 20 – PROPORÇÕES DE SOLVENTES, RENDIMENTOS EM MASSA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE FOSFOMOLIBDÊNIO E DPPH E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *M. sylvestris*

EXTRATO	PROPORÇÕES DE SOLVENTES	RENDIMENTO (%)	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (IC ₅₀)	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (% rutina ± DP)	POLIFENÓIS (mg/g ± DP)
1	a (1)	42,40	241,27±8,16	19,83±2,29	47,37±7,65
2	m (1)	36,98	185,44±6,43	34,17±1,43	115,42±14,64
3	e (1)	22,56	103,48±1,23	39,56±3,28	150,10±14,52
4	ac (1)	20,08	87,98±0,70	44,72±1,82	104,12±4,28
5	a:m (1:2/1:2)	30,96	107,46±1,20	30,27±0,39	164,61±9,41
6	a:ac (1:2/1:2)	31,35	111,09±12,47	38,64±2,56	220,14±7,68
7	a:e (1:2/1:2)	30,79	91,30±0,84	23,85±3,19	307,35±3,43
8	m:ac (1:2/1:2)	34,00	93,64±0,40	30,84±3,86	200,87±4,46
9	m:e (1:2/1:2)	30,52	88,92±0,83	48,50±4,31	103,16±9,40
10	e:ac (1:2/1:2)	27,11	75,42±1,74	34,05±2,25	161,84±11,35
11	a:m:ac (1:3/1:3/1:3)	34,34	120,97±2,47	20,41±1,10	233,12±13,60
12	a:m:e (1:3/1:3/1:3)	37,40	99,57±1,38	45,98±4,03	192,04±8,81
13	a:e:ac (1:3/1:3/1:3)	35,64	94,75±0,85	36,92±0,19	212,34±7,67
14	m:e:ac (1:3/1:3/1:3)	30,89	90,64±1,00	30,16±4,56	208,25±7,97
15	a:m:e:ac (1:4/1:4/1:4/1:4)	32,11	273,18±2,44	25,80±0,91	221,11±18,78
16	a:m:e:ac (1:4/1:4/1:4/1:4)	33,86	171,13±0,49	24,88±2,01	224,16±6,36
17	a:m:e:ac (1:4/1:4/1:4/1:4)	34,49	385,12±9,06	24,88±1,20	227,31±12,54
18	a:m:e:ac (1:4/1:4/1:4/1:4)	32,98	317,11±3,77	25,34±0,86	226,83±8,67
19	a:m:e:ac (1:4/1:4/1:4/1:4)	33,10	181,14±1,51	27,98±2,01	219,22±7,72

NOTA 1: a = água; m = metanol; e = etanol; ac = acetona

NOTA 2: DP = desvio padrão

Foram construídos modelos lineares, quadráticos e cúbicos para obtenção de modelos de superfícies de resposta para o rendimento em massa. Apesar de serem obtidos valores de R^2 para a superfície acima de 0,90 (Tabela 21), em todos os casos a falta de ajuste do modelo foi estatisticamente significativa segundo os testes de ANOVA ($p \leq 0,05$). No modelo linear, todos os fatores (água, metanol, etanol e acetona) foram significativos para a construção do modelo ($p \leq 0,001$). No modelo quadrático, somente foram significativos os fatores relacionados aos solventes puros e à interação binária entre etanol e acetona ($p \leq 0,028$), e no modelo cúbico especial, os únicos fatores significativos foram os solventes puros e as interações binárias entre água e metanol e entre etanol e acetona ($p \leq 0,040$).

TABELA 21 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO EM MASSA (%)

MODELO	VALOR DE p DO MODELO	R^2	R^2 AJUSTADO	VALOR DE p DA FALTA DE AJUSTE DO MODELO
Linear	0,001	0,63	0,56	0,006
Quadrático	0,003	0,87	0,75	0,014
Cúbico especial	0,010	0,96	0,85	0,013

FONTE: O Autor, (2013)

Dessa forma, apesar do valor de R^2 ajustado do modelo cúbico especial ser superior a 0,85, em nenhum modelo a falta de ajuste do modelo não foi significativa utilizando todos os termos gerados pelas equações (solventes utilizados isoladamente ou em associações binárias, ternárias ou quaternária, quando o modelo permitisse). Assim, não puderam ser construídos modelos de superfícies de resposta com valor preditivo adequado para a análise do rendimento.

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos pelo método do DPPH, as concentrações de extrato que atingiram o IC_{50} foram muito variáveis de acordo com o solvente utilizado, atingindo valores entre 75 $\mu\text{g/mL}$ e 385 $\mu\text{g/mL}$, quando utilizada a mistura binária etanol/acetona ou a mistura quaternária, respectivamente. Durante a elaboração das curvas para determinação do IC_{50} , o valor do R^2 sempre foi superior a 0,95. Como pode ser observado na Tabela 22, apesar dos modelos linear, quadrático e cúbico terem sido estatisticamente significativos, a falta de ajuste destes modelos também o foi, o que restringe muito a capacidade preditiva dos modelos.

TABELA 22 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

MODELO	VALOR DE p DO MODELO	R^2	R^2 AJUSTADO	VALOR DE p DA FALTA DE AJUSTE DO MODELO
Linear	0,017	0,089	0,038	<0,001
Quadrático	0,029	0,191	0,036	<0,001
Cúbico especial	<0,001	0,740	0,662	<0,001

FONTE: O Autor, (2013)

Para determinar as equações das superfícies de resposta, no modelo linear todos os fatores (solventes puros) são significativos ($p=0,024$) e no modelo quadrático, somente são significativos os termos água e metanol ($p=0,016$). Já para o modelo cúbico, somente não são significativas as interações binárias entre metanol e acetona ($p=0,112$) e entre etanol e acetona ($p=0,673$). Todos os solventes puros, demais interações binárias (água/metanol, água/etanol, água/acetona e metanol/etanol) e todas as interações terciárias foram estatisticamente significativas ($p=0,038$).

Semelhantemente, para os modelos elaborados para a avaliação da atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, apesar de todos os modelos serem significativos, para todos eles a falta de ajuste também foi significativa. Nada obstante, valores de R^2 ajustado superiores a 0,87 foram observados para o modelo cúbico, ou seja, quase 90% dos dados das variáveis dependentes conseguem ser explicadas pelos regressores presentes no modelo. A Tabela 23 mostra os valores de p e de coeficientes de determinação para os modelos que avaliaram a atividade antioxidante pelo método do fosfolibdênio.

TABELA 23 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO FOSFOLIBDÊNIO

MODELO	VALOR DE p DO MODELO	R^2	R^2 AJUSTADO	VALOR DE p DA FALTA DE AJUSTE DO MODELO
Linear	<0,001	0,27	0,23	<0,001
Quadrático	<0,001	0,62	0,55	<0,001
Cúbico especial	<0,001	0,90	0,87	<0,001

FONTE: O Autor, (2013)

Para determinar as equações das superfícies de resposta, no modelo linear todos os fatores são estatisticamente significativos ($p<0,001$), porém no

modelo quadrático somente são significativos os fatores relacionados aos solventes puros ($p < 0,001$) e os fatores relacionados a misturas binárias entre os solventes metanol e etanol ($p < 0,001$), metanol e acetona ($p = 0,043$) e etanol e acetona ($p = 0,001$). Já para o modelo cúbico, apenas não foram significativos os termos relacionados à mistura binária entre água e metanol ($p = 0,058$) e à mistura terciária entre água, etanol e acetona ($p = 0,464$).

Foram também realizadas as quantificações de compostos fenólicos (polifenóis). A Tabela 20 mostra os valores obtidos, em mg/g de extrato, utilizando todos solventes ou combinações de solventes. Quando os solventes são utilizados isoladamente, aquele que melhor consegue extrair compostos fenólicos é o etanol (aproximadamente 150 mg/g), seguido do metanol (aproximadamente 115 mg/g), acetona (105 mg/g) e água (50 mg/g). Quando misturas binárias foram aplicadas, os teores de polifenóis variaram de aproximadamente 100 mg/g (mistura entre metanol e etanol) até mais de 300 mg/g (mistura água etanol). Misturas terciárias e quaternária não proporcionaram quantidades de polifenóis extraídos superiores a 230 mg/g de folhas.

A Tabela 24 mostra os resultados obtidos para os modelos de superfícies de resposta no que diz respeito à determinação de fenólicos totais (mg/g).

TABELA 24 – VALORES DE p E DE COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS DURANTE A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

MODELO	VALOR DE p DO MODELO	R^2	R^2 AJUSTADO	VALOR DE p DA FALTA DE AJUSTE DO MODELO
Linear	0,337	0,036	0,004	$< 0,001$
Quadrático	$< 0,001$	0,89	0,88	$< 0,001$
Cúbico especial	$< 0,001$	0,95	0,94	0,671

FONTE: O Autor, (2013)

Para o modelo linear, todos os fatores foram estatisticamente significativos ($p < 0,001$), apesar de o modelo não ser significativo ($p = 0,337$). Já para o modelo quadrático, todos os fatores relacionados aos solventes puros foram significativos, e das misturas binárias, somente aquela envolvendo o metanol e a acetona não foi significativa ($p = 0,651$).

O modelo cúbico especial foi considerado estatisticamente significativo ($p < 0,001$) e a sua falta de ajuste foi considerada não significativa ($p = 0,671$), além dos coeficientes de determinação deste modelo possibilitarem a explicação aproximadamente 95% dos dados das variáveis dependentes. Todos os fatores puros foram considerados significativos, e das misturas, somente a mistura binária entre metanol e acetona ($p = 0,355$) foi não significativa, como pode ser observado na Tabela 25.

TABELA 25 – COEFICIENTES E ERROS PADRÃO DE CADA FATOR NA DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE PREDIÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

FATOR	COEFICIENTE DA EQUAÇÃO	ERRO PADRÃO	VALOR DE p	-95% LIMITE DE CONFIANÇA	+95% LIMITE DE CONFIANÇA
(A) Água	47,46	6,1760	<0,001	35,17	59,748
(B) Metanol	115,46	6,1760	<0,001	103,18	127,753
(C) Etanol	150,15	6,1760	<0,001	137,86	162,434
(D) Acetona	104,17	6,1760	<0,001	91,88	116,455
AB	331,29	30,0610	<0,001	271,48	391,104
AC	924,83	30,0610	<0,001	865,02	984,644
AD	404,05	30,0610	<0,001	344,24	463,863
BC	270,95	30,0610	<0,001	211,14	330,759
*BD	-27,92	30,0610	0,355	-87,73	31,891
CD	137,44	30,0610	<0,001	77,63	197,255
ABC	487,94	188,6383	0,011	112,61	863,271
ABD	-873,34	188,6383	<0,001	-1248,67	-498,007
ACD	-1351,49	188,6383	<0,001	-1726,83	-976,163
BCD	1183,56	188,6383	<0,001	808,23	1558,895

NOTA: *O fator BD (mistura binária entre metanol e acetona) não foi considerado significativo ($p = 0,355$)

A quantificação de compostos fenólicos totais, portanto, pode ser prevista a partir de um modelo cúbico especial. Este modelo considerando apenas os fatores estatisticamente significativos, com nível de confiança de 95%, é dado pela Equação 10:

$$\begin{aligned} \text{Fenólicos Totais} = & \frac{47,46a}{(\pm 6,17)} + \frac{115,46m}{(\pm 6,17)} + \frac{150,15e}{(\pm 6,17)} + \frac{104,17ac}{(\pm 6,17)} + \frac{331,29am}{(\pm 30,06)} + \frac{924,83ae}{(\pm 30,06)} + \frac{404,05}{(\pm 30,06)} \\ & + \frac{270,95me}{(\pm 30,06)} + \frac{137,44eac}{(\pm 30,06)} + \frac{487,94ame}{(\pm 188,63)} - \frac{873,34amac}{(\pm 188,63)} - \frac{1351,49aeac}{(\pm 188,63)} + \frac{1183,56}{(\pm 188,63)} \end{aligned} \quad (\text{Equação 10})$$

Adicionalmente, é possível relacionar a importância de cada coeficiente da equação através de um diagrama de Pareto, como mostrado na Figura 51.

Diagramas de Pareto são gráficos de colunas que ordenam os efeitos do modelo (neste caso, os coeficientes da equação), possibilitando a sua priorização. Mais uma vez, nota-se que a variável referente a interação binária entre os solventes metanol (B) e acetona (D) é a que menos contribui para o modelo, tanto que não foi considerada estatisticamente significativa (considerando $p < 0,05$).

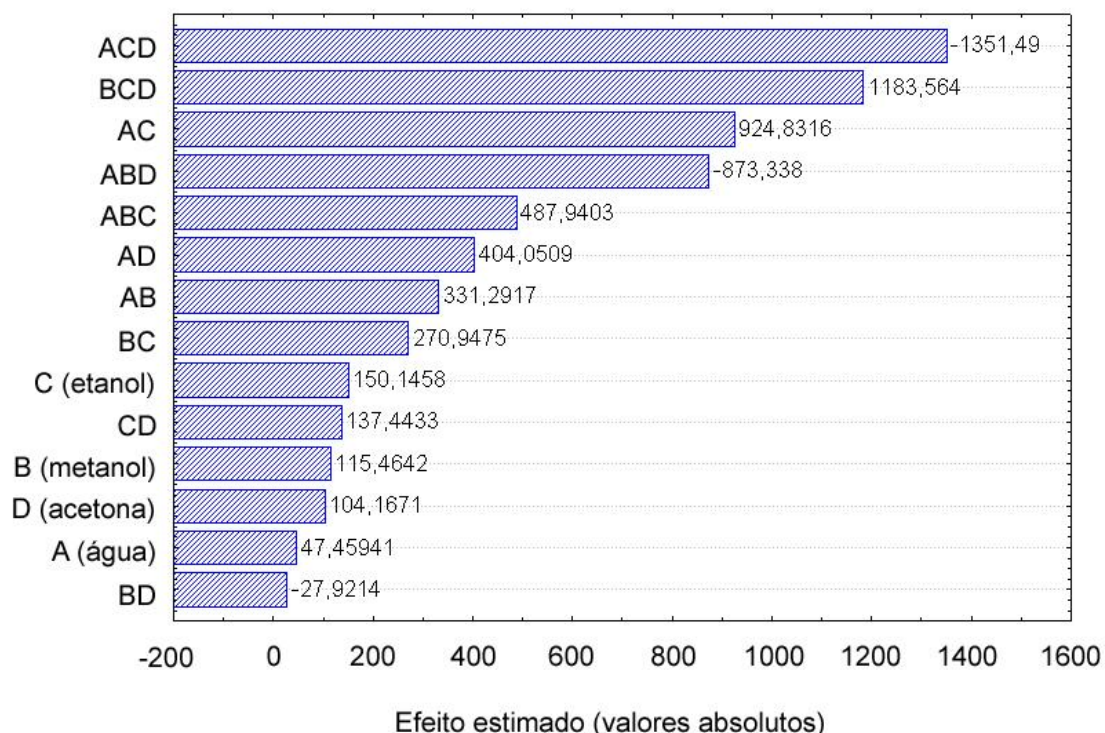


FIGURA 51 – DIAGRAMA DE PARETO RELACIONANDO OS EFEITOS DE CADA VARIÁVEL PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL DE PREDIÇÃO DE TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS
 FONTE: O Autor, (2013)

Como pode ser observado na Tabela 25, na Figura 51 e na equação 10 todos os efeitos significativos binários são sinérgicos, e a maioria deles (com exceção da interação metanol:acetona) contribuem mais para a extração de compostos fenólicos (e consequentemente para uma maior quantificação no extrato) do que os solventes puros isolados. O maior valor para mistura binária observado foi para a interação água:etanol, seguida da interação água:acetona e então a interação água:metanol. Interações que não envolveram água apresentaram coeficientes menores, apesar de ainda significativos com 95% de nível de confiança. As interações terciárias envolvendo água:metanol:etanol e

metanol:etanol:acetona foram sinérgicas, ao passo que interações envolvendo água:metanol:acetona e água:etanol:acetona foram antagônicas. Quando analisadas somente as interações terciárias, a associação entre água e acetona parece prejudicar a eficiência da extração e consequentemente o teor de fenólicos; quando o terceiro componente é o etanol, o coeficiente negativo da associação (-1351,49) se torna mais relevante do que quando o terceiro componente é o metanol (-873,34). Tanto o etanol quanto a acetona (em suas interações) proporcionaram extratos cujo teor de compostos fenólicos é maior que os solventes puros isolados. Porém, dado este fator negativo nas associações terciárias envolvendo água e acetona, aliado ao fato de a acetona ser um solvente controlado pela Polícia Federal (Lista II da Portaria 1.274 de 25/08/2003, do Ministério da Justiça) e em média 50% mais caro que o etanol, todas as análises estatísticas e o modelo de superfície de resposta proposto foram baseados na interação entre água:metanol:etanol. Assim, é mostrada na Figura 52, a superfície de resposta que representa a quantificação de compostos fenólicos, considerando estas interações.

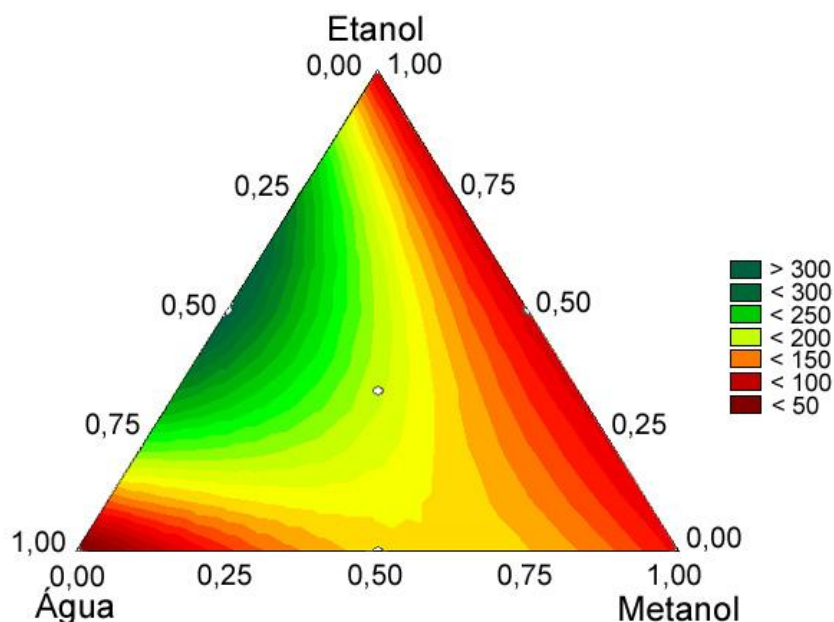


FIGURA 52 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CÚBICO ESPECIAL PARA PREDIÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *M. sylvestris* (mg/g) EM FUNÇÃO DAS PROPORÇÕES DE ÁGUA, METANOL E ETANOL

FONTE: O Autor, (2013)

Os maiores valores de quantificação de compostos fenólicos são obtidos com uma mistura entre água e etanol. Isso inclusive pode ser corroborado através da observação dos coeficientes da equação, sendo que, quando são consideradas apenas as interações binárias entre os solventes considerados (água, metanol e etanol), o coeficiente da mistura água:etanol é o que produz o maior efeito sinérgico (+924,83). Analisando a Figura 52, uma pequena vantagem pode ser observada quando na mistura existe uma concentração maior de etanol. Dessa forma, ficou estabelecida a relação 70% em volume de etanol e 30% em volume de água para a obtenção de todos os extratos utilizados durante este trabalho.

Considerando esta proporção de solventes e aplicando a equação gerada para este modelo, é possível prever o valor da quantificação de fenólicos totais obtidos no extrato, de acordo com a Figura 53.

$$\begin{aligned} \text{Fenólicos Totais} &= 47,46.(0,3) + 150,15.(0,7) + 924,83(0,3.0,7) \\ \text{Fenólicos Totais} &= 14,24 + 105,10 + 194,21 = 313,5 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

FIGURA 53 – APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO DE DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS PELO MODELO CUBICO ESPECIAL PARA AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *M. sylvestris*
FONTE: O Autor, (2013)

Um experimento confirmatório de determinação de fenólicos totais, em triplicata, foi realizado com o solvente etanol 70% nas mesmas condições em que os experimentos para estabelecer a superfície de resposta foram executados. O resultado obtido foi de $309,0 \pm 14,2$ mg/g, mostrando boa concordância com o modelo obtido, que prediz o valor de 313,5 mg/g de fenólicos totais.

Dessa forma, foi possível observar que apesar de o modelo cúbico especial ser o mais complexo e trabalhoso de ser obtido (dado que foi necessário maior número de experimentos e maior número de interações entre os solventes), este foi o único a não apresentar falta de ajuste significativa.

Assim, a consistência dos experimentos e do modelo foi considerada adequada, pois a diferença entre o valor médio obtido e o valor predito foi de apenas 4,5 mg/g ou 1,43%

5.3.2 Método por CLAE/EM-EM para determinação de malvidinas em extratos de folhas e flores de *M. sylvestris*

Para o desenvolvimento do método, foi escolhida a fonte de ionização do tipo *Electrospray* (ESI), em função da sua versatilidade no que tange à polaridade e à forma branda como ioniza os compostos. Após a definição da fonte de ionização, o próximo passo foi a checagem do sinal dos analitos. A Figura 54 mostra, no modo positivo de ionização, os íons moleculares dos compostos malvidina aglicona (331,1 m/z), malvidina 3-glucosídeo (493,0 m/z) e malvidina 3,5-diglucosídeo (654,9 m/z).

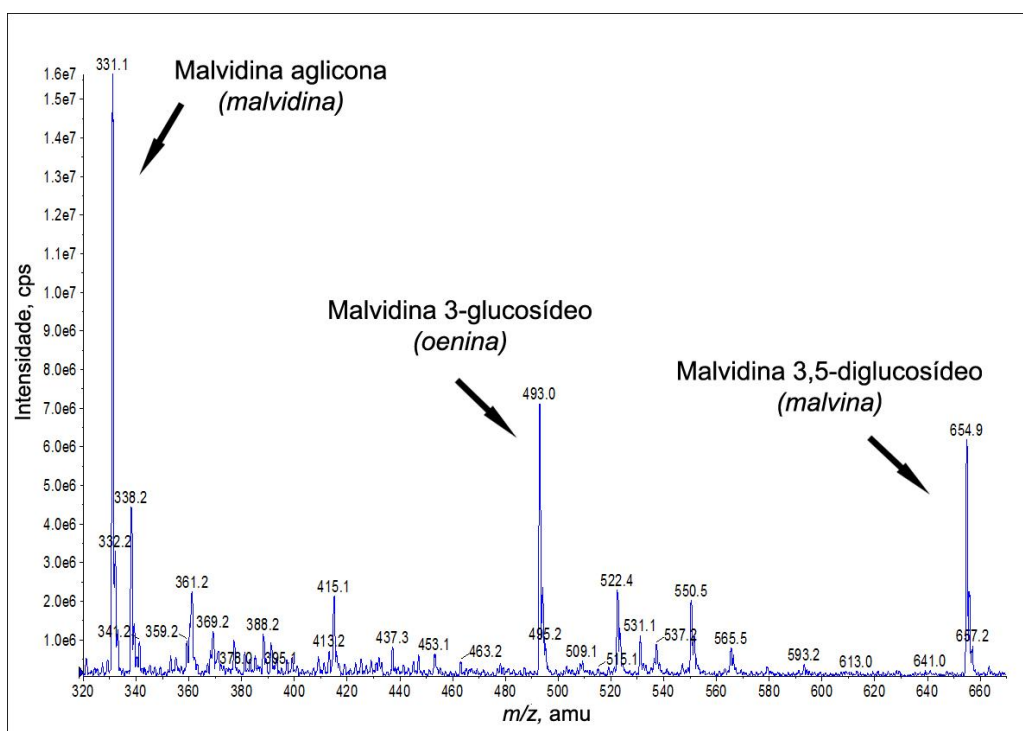


FIGURA 54 - AVALIAÇÃO DOS ÍONS MOLECULARES $[M + H]^+$ DOS PADRÕES DE MALVIDINA AGLICONA, MALVIDINA 3-GLUCOSÍDEO E MALVIDINA 3,5-DIGLUCOSÍDEO, UTILIZANDO IONIZAÇÃO NO MODO POSITIVO
FONTE: O Autor, (2014)

Após a identificação do sinal de cada malvidina, foi realizado o experimento de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para otimização automática dos parâmetros individuais de voltagem dos compostos. Os parâmetros de voltagem ajustados foram o potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na célula de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP). Ao término da otimização automática, ficou definido que o modo positivo de ionização foi o mais eficiente para ionizar os compostos de interesse.

Foram obtidos os dois fragmentos de íons mais intensos de cada composto, sendo o fragmento mais intenso utilizado para quantificação e o segundo fragmento mais intenso para a qualificação do sinal analítico. Assim, foram considerados os seguintes fragmentos de íons, em ordem decrescente de intensidade: malvidina aglicona (314,9 m/z e 286,9 m/z), malvidina 3-glucosídeo (314,9 m/z e 330,9 m/z) e malvidina 3,5-diglucosídeo (331,0 m/z e 493,0 m/z). A Tabela 26 mostra os parâmetros de voltagem ajustados de cada composto.

TABELA 26 – PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE MALVIDINA AGLICONA, MALVIDINA 3-GLUCOSÍDEO E MALVIDINA 3,5-DIGLUCOSÍDEO

COMPOSTO (ÍON MOLECULAR, m/z)	FRAGMENTOS DE ÍONS (m/z)	VOLTAGEM (V)				
		DP ¹	EP ²	CEP ³	CE ⁴	CXP ⁵
Malvidina aglicona (331,1)	314,9	66	10,5	22	37	6
	286,9	66	10,5	22	39	4
Malvidina 3-glucosídeo (493,0)	314,9	41	7,5	22	61	6
	330,9	41	7,5	22	29	6
Malvidina 3,5-diglucosídeo (654,9)	331,0	51	9,5	26	39	6
	493,0	51	9,5	26	27	8

NOTA: ⁽¹⁾ Potencial de desagregação

⁽²⁾ Potencial de entrada

⁽³⁾ Potencial de entrada na célula de colisão

⁽⁴⁾ Energia de colisão

⁽⁵⁾ Potencial de saída da célula de colisão

A próxima etapa de otimização do espectrômetro de massas foi o ajuste dos parâmetros da fonte de ionização, realizado através do método de Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Os parâmetros otimizados nessa etapa foram: gás de interface (CUR): 10 psi; gás decolisão (CAD): 5 psi; gás de nebulização (GS1): 45 psi; gás auxiliar (GS2): 45 psi; voltagem do capilar (IS): 5500 V e temperatura da fonte: 450°C.

Ao término das otimizações do espectrômetro de massas, foram realizados os ajustes cromatográficos, objetivando um método rápido, com o menor uso de solvente orgânico possível e com picos simétricos e o mais afilados possível. Após alguns testes utilizando colunas do tipo C18 e fases móveis envolvendo gradiente acetonitrila e água com ácido fórmico, os cromatogramas obtidos não foram considerados adequados por não apresentarem um adequado formato de pico (picos não afilados) ou por serem corridas muito extensas (superiores a 25 minutos). Com o objetivo de diminuir o tempo de corrida e obter picos com formato adequado, foi considerado o uso de colunas de amida do tipo HILIC (Cromatografia com Interação Hidrofílica, em português CIH), que são comumente utilizadas na separação de antocianidinas e antocianinas como as malvidinas. Após a realização de diversos testes cromatográficos, foi definida a utilização da coluna do tipo HILIC (XBridge™ Amida, 3,5 µm, 4,6x250 mm, Waters® Corporation, EUA), com a fase móvel composta por acetonitrila e água, eluídas no modo gradiente. Esta composição do gradiente de fase móvel (mostrada na Tabela 27), proporcionou uma corrida com tempo de 16 minutos e um adequado formato de pico de todos os compostos.

TABELA 27 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE MALVIDINAS

TEMPO (min)	FLUXO (µL/min)	SOLVENTES	
		Água 0,1% AFO (%)	Acetonitrila 0,1% AFO (%)
0,0	350	90	10
3,0	350	70	30
6,0	350	70	30
6,1	350	90	10
16,0	350	90	10

FONTE: O autor (2014)

Os demais parâmetros cromatográficos foram fluxo de fase móvel ajustado em 350 µL/min, volume de injeção de 20 µL e temperatura do forno da coluna de 50°C. Após estas definições, o cromatograma representativo das malvidinas analisadas, utilizando uma mistura de padrões a 100 ng/ml de cada, é mostrado na Figura 55.

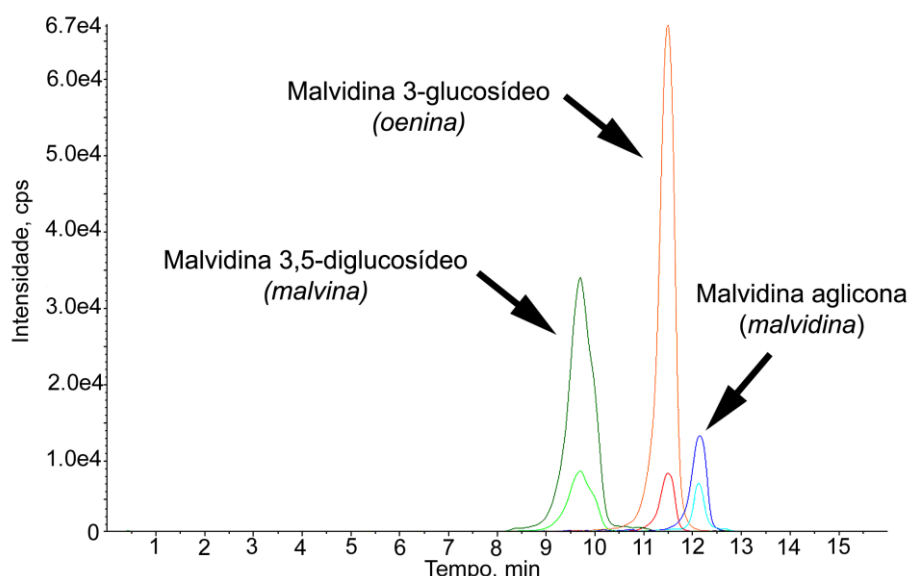


FIGURA 55 – CROMATOGRAMA RELATIVO A MISTURA DE PADRÕES DE E MALVIDINA AGLICONA, MALVIDINA 3-GLUCOSÍDEO E MALVIDINA 3,5-DIGLUCOSÍDEO

Utilizando as mesmas proporções de solventes propostos na Tabela 18, foram elaborados extratos de folhas de *M. sylvestris* (um total de 15 extratos) os quais foram analisados pelo método cromatográfico desenvolvido. O objetivo foi verificar a presença dos compostos nos extratos de folhas de *M. sylvestris*. Adicionalmente, foram analisados separadamente extratos metanólicos de flores de *M. sylvestris*. Os cromatogramas de todos os extratos foram comparados com cromatogramas obtidos com padrões das três malvidinas, e a confirmação se deu através da análise das massas presentes nos picos cromatográficos. A Figura 56 mostra os cromatogramas obtidos com os extratos das folhas.

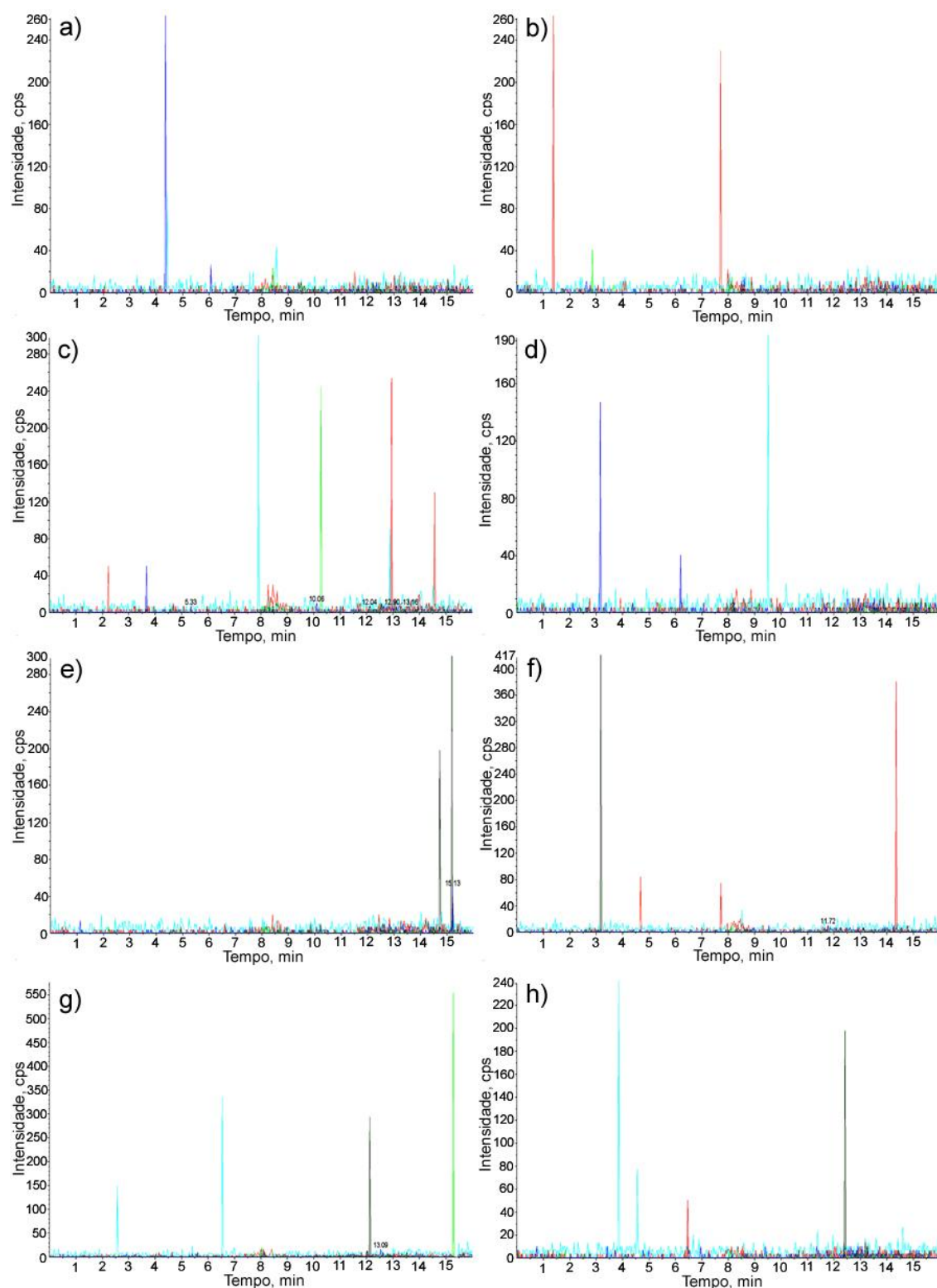
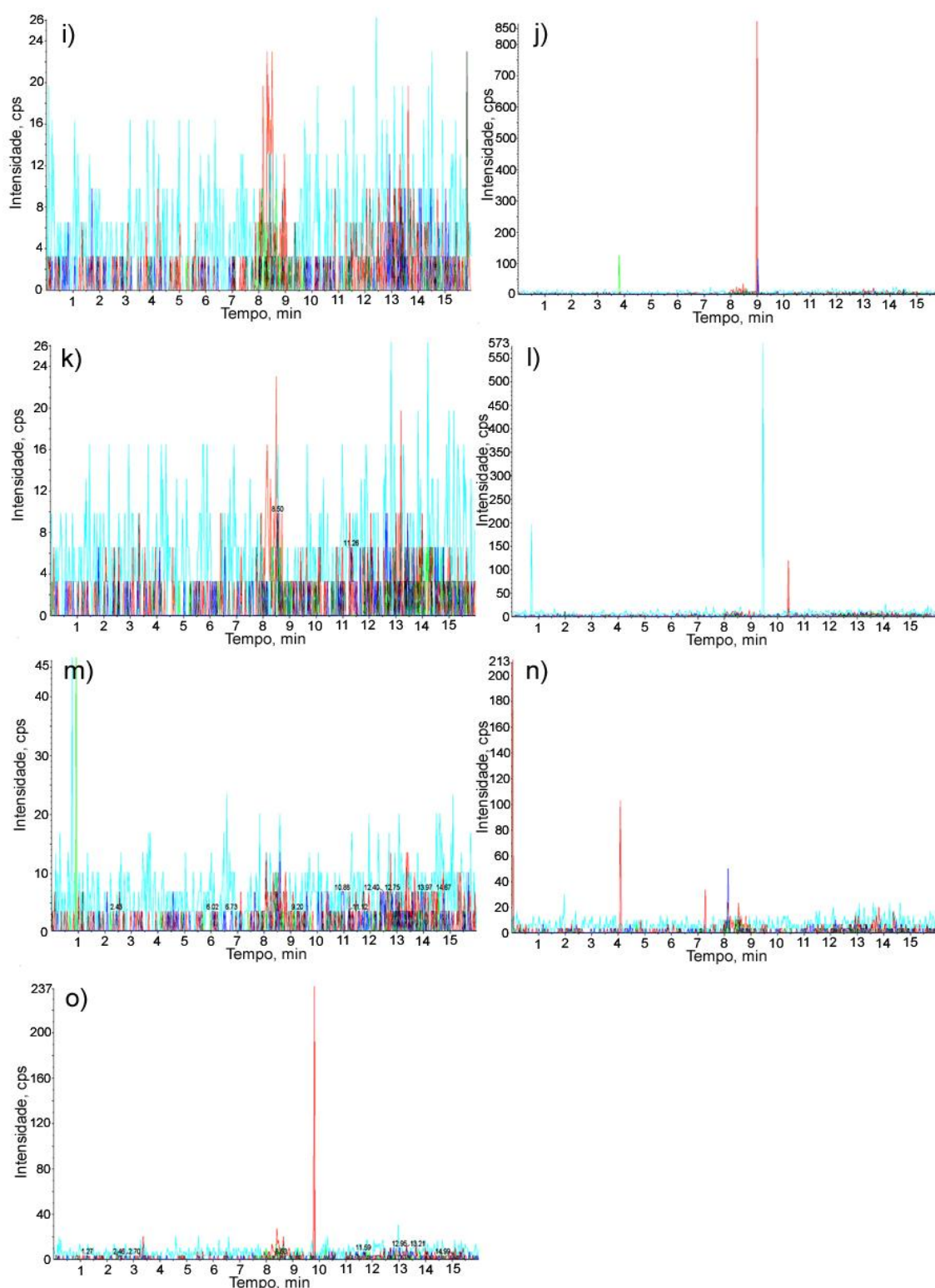


FIGURA 56 – CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *M. sylvestris* UTILIZANDO COMO SOLVENTE EXTRATOR DIFERENTES PROPORÇÕES DOS SOLVENTES ÁGUA, METANOL, ETANOL E ACETONA

NOTA: os solventes ou misturas de solventes utilizadas foram: a) água; b) metanol; c) etanol; d) acetona; e) água:metanol; f) água:acetona; g) água:etanol; h) metanol:acetona; i) metanol:etanol; j) etanol:acetona; k) água:metanol:acetona; l) água:metanol:etanol; m) água:etanol:acetona; n) metanol:etanol:acetona; o) água:metanol:etanol:acetona



(continuação) FIGURA 56 – CROMATOGRAMAS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *M. sylvestris* UTILIZANDO COMO SOLVENTE EXTRATOR DIFERENTES PROPORÇÕES DOS SOLVENTES ÁGUA, METANOL, ETANOL E ACETONA

NOTA: os solventes ou misturas de solventes utilizadas foram: a) água; b) metanol; c) etanol; d) acetona; e) água:metanol; f) água:acetona; g) água:etanol; h) metanol:acetona; i) metanol:etanol; j) etanol:acetona; k) água:metanol:acetona; l) água:metanol:etanol; m) água:etanol:acetona; n) metanol:etanol:acetona; o) água:metanol:etanol:acetona

É possível analisar em todos os cromatogramas da Figura 56 que nenhum pico cromatográfico foi observado, nem quando foram utilizados solventes puros e nem quando foram utilizados solventes extratores compostos de misturas binárias, ternárias ou quaternária. A análise destes extratos obtidos de folhas foi realizada em função de a Farmacopéia Brasileira 4ª Edição (a última a conter monografia sobre a planta questão) considerar como “droga vegetal” apenas as folhas da *M. sylvestris*. Todas as descrições macroscópicas e microscópicas de pó são relacionadas às folhas, bem como o próprio método de identificação da planta. Segundo esta edição da Farmacopéia, a *M. sylvestris* deve ser identificada através de cromatografia em camada delgada, onde a mancha da amostra (extrato metanólico ácido de folhas) deve ser comparada com a mancha do padrão “malvidina monoglicosídeo” cujo valor de R_f é de aproximadamente 0,40. Para complementar a identificação, o cromatograma da amostra deve apresentar outras duas manchas com R_f aproximadamente de 0,45 e 0,70.

Apesar de a Farmacopéia considerar apenas o uso de folhas de *M. sylvestris*, o Anexo I da RDC ANVISA N° 10 de 9 de março de 2010 considera que a planta possui indicações terapêuticas contra afecções respiratórias e processos inflamatórios de boca e garganta quando suas folhas e flores são utilizadas na forma de infuso, administradas tanto por via oral quanto tópica. Dessa forma, extrato metanólico de flores de *M. sylvestris* (obtidas na época de floração da planta, no mesmo local onde foram coletadas as amostras para exsicata) foi submetido a análise cromatográfica para a avaliação da presença de malvidinas. O cromatograma referente ao extrato de flores (na concentração de 500 ng/mL) e à mistura de padrões de malvidina, malvina e oenina (na concentração de 100 ng/mL cada) é mostrado na Figura 57.

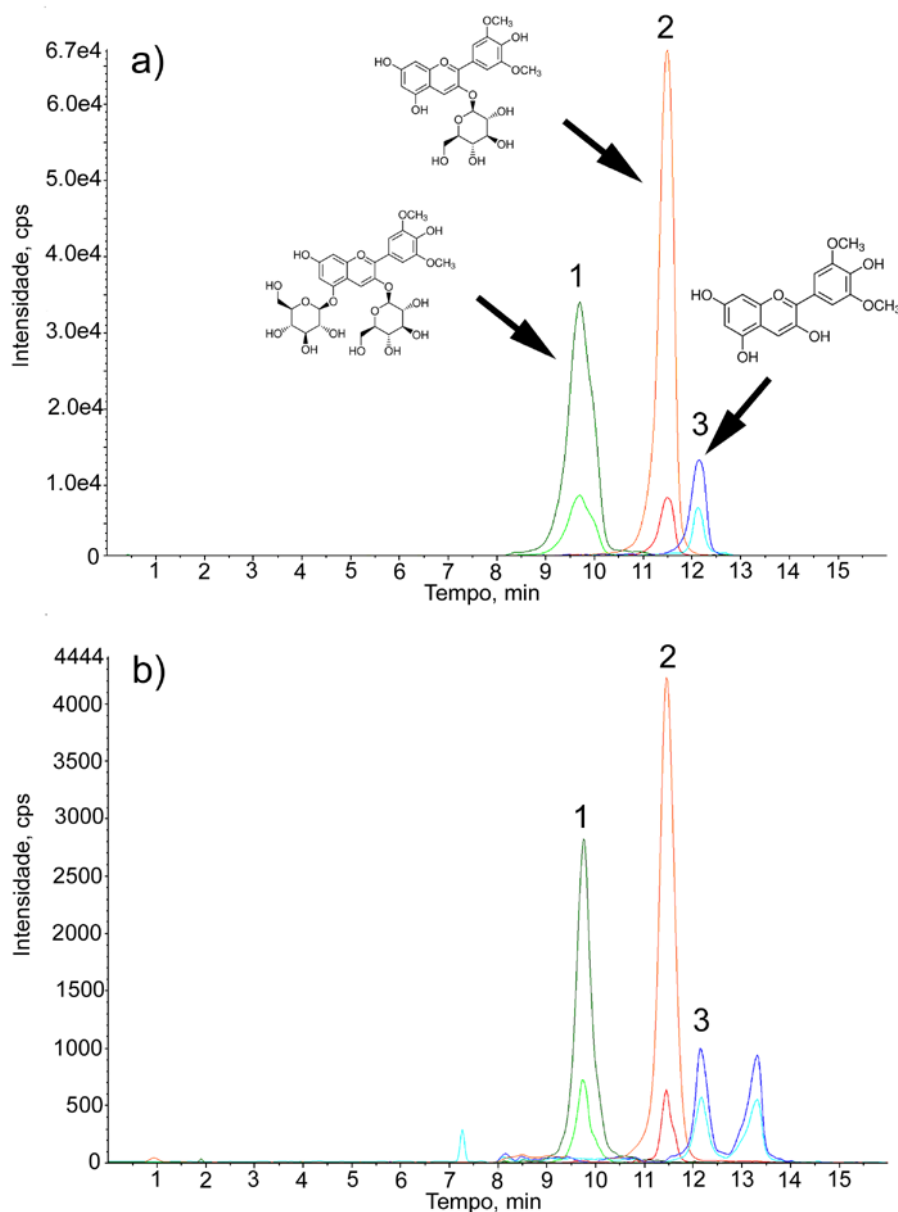


FIGURA 57 – (a) CROMATOGRAMA RELATIVO A MISTURA DE PADRÕES DE MALVIDINAS; (b) CROMATOGRAMA RELATIVO A EXTRATO METANÓLICO DE FLORES DE *M. sylvestris*

NOTA: nos dois cromatogramas, o pico 1 representa a malvidina 3,5-diglicosídeo (malvina); o pico 2 representa a malvidina 3-glicosídeo (oenina); o pico 3 representa a malvidina aglicona (malvidina)

Como pode ser observado na Figura 57, o extrato oriundo de flores de *M. sylvestris* apresenta as três malvidinas pesquisadas. Dessa forma, fica comprovada a existência destes marcadores na planta, porém não com o uso de extratos de folhas como propõe a Farmacopéia Brasileira 4ª Edição. Em geral, no Brasil, as flores da *M. sylvestris* não são utilizadas como matéria-prima nos produtos cuja composição envolve esta planta. Em nenhuma

amostra comercial obtida para os estudos quimiométricos do Capítulo 2 deste trabalho, foi observada a presença de flores em associação com folhas.

Como foi apresentado no Capítulo 1 deste trabalho, com relação à atividade anti-inflamatória, ainda que as malvidinas presentes nas flores provavelmente não sejam as únicas responsáveis pelo efeito terapêutico, o extrato de flores apresentou uma maior capacidade de inibir a liberação de mediadores inflamatórios do que qualquer extrato (bruto ou fracionado) obtido com as folhas. Este fato é corroborado por trabalhos realizados com malvidina 3-glucosídeo, a qual mostrou atividade anti-inflamatória dose-dependente em modelos de inflamação induzidos por TPA (PRUDENTE *et. al.*, 2013).

Dessa forma, considerar compostos da família das malvidinas como marcadores para a espécie *M. sylvestris* só será adequado se forem consideradas as flores da espécie, pois neste estudo o uso da cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas não foi sensível para detectar a presença destes compostos nos extratos obtidos com as folhas.

5.4 CONCLUSÃO

Utilizando planejamentos experimentais do tipo Centróide Simplex, foi possível modificar as taxas de rendimento de massa extraída, de atividade antioxidante (métodos do fosfomolibdênio e do DPPH) e de quantificação de polifenóis em extratos de folhas de *M. sylvestris*, obtidos com os solventes água, metanol, etanol e acetona (e suas misturas). Com os resultados das análises de quantificação de polifenóis, foi possível modelar uma superfície de resposta estatisticamente significativa e cuja falta de ajuste foi considerada insignificante. Esta superfície de resposta foi obtida com um modelo cúbico especial, que requer a realização de apenas 14 experimentos, considerando solventes puros e misturas binárias e terciárias. Desconsiderando o uso da acetona, que apresenta um custo maior e cuja obtenção é mais complicada, este modelo mostra que a combinação entre aproximadamente 70% de etanol e 30% de água fornece o extrato que apresenta a maior quantidade de polifenóis dentre as combinações avaliadas. Experimentalmente, foi obtido o teor de polifenóis de $309,0 \pm 14,2$ mg/g de folha; utilizando a equação proposta pelo modelo, são preditos 315,5 mg de polifenóis por grama de folhas. Dado o bom resultado obtido com esta mistura, esta foi a composição de solventes utilizada nas extrações que avaliaram a atividade anti-inflamatória (Capítulo 1 deste trabalho).

Utilizando as mesmas proporções de solventes do planejamento Centróide Simplex foram obtidos extratos de folhas de *M. sylvestris*, os quais foram avaliados quanto à presença de malvidinas através de CLAE-EM/EM. Adicionalmente, foram analisados extratos obtidos das flores desta espécie. Nenhum pico referente às malvidinas foi detectado nos extratos das folhas, porém no extrato de flores foram detectados picos referentes à malvidina 3,5-diglucosídeo (malvina), malvidina 3-glucosídeo (oenina) e malvidina aglicona (malvidina). Dessa forma, ficou comprovada a existência dos marcadores desta espécie nas flores da planta, e não nas folhas, como recomenda a Farmacopéia Brasileira.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados durante o desenvolvimento desta tese podem ser analisados de forma conjunta, pois as informações contidas em cada capítulo se complementam para que seja atingida uma conclusão geral. No primeiro capítulo, através de um método desenvolvido e validado para quantificações via CLAE-EM/EM de alguns mediadores inflamatórios (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e TXB_2) extraídos do sobrenadante de cultivo celular contendo macrófagos RAW 264.7, foi constatado que das três espécies de “Malvas” analisadas, a *S. cordifolia* foi a que teve a maior capacidade de reduzir a produção dos mediadores inflamatórios, seguida das flores e das folhas de *M. sylvestris*. É interessante perceber que, como descrito no segundo capítulo, ocorrem significativos problemas de rotulagem e identificação equivocada entre as espécies *S. cordifolia* e *M. sylvestris*, e isso se deve principalmente pela dificuldade de encontrar *M. sylvestris* (considerada como uma malva “verdadeira”) no Brasil. Porém, mesmo não sendo nativa, a espécie *M. sylvestris* possui uma monografia na Farmacopéia Brasileira 4ª edição e seu uso é estimulado e recomendado pela RDC ANVISA nº 10/2010. Portanto, são necessários estudos adicionais (principalmente *in-vivo*) para incluir a espécie *S. cordifolia*, que é facilmente encontrada no Brasil, na relação das plantas medicinais de uso tradicional recomendadas pela ANVISA. Assim, mais evidências científicas confirmarão a efetividade anti-inflamatória desta espécie, quando utilizada na forma de decoctos, macerados e infusões que caracterizam o uso caseiro.

Os ensaios de atividade anti-inflamatória com a *M. sylvestris* foram realizados com extratos obtidos com solvente contendo 70% de etanol e 30% de água. No terceiro capítulo desta tese, foram quantificados os fenólicos totais de extratos desta espécie obtidos com diversas combinações entre os solventes água, metanol, etanol e acetona, e os resultados mostraram que com o solvente etanol/água 70:30 (v/v) fornece um extrato com um dos maiores teores de polifenóis dentre os solventes testados. Assim, os resultados do terceiro capítulo complementam os resultados do primeiro, pois diversos autores relacionam diretamente a presença de polifenóis no extrato com a

intensidade da atividade anti-inflamatória observada. Ainda no terceiro capítulo, foram avaliados os extratos de folhas de *M. sylvestris* (obtidos com todas as combinações de misturas de solventes considerados nas extrações) e de flores desta espécie, quanto à presença de marcadores conhecidos genericamente como “malvidinas”. Com o método cromatográfico utilizado, somente foi possível detectar a presença destas substâncias nas flores, e não nas folhas desta espécie. Assim, é possível que a maior redução na liberação de mediadores inflamatórios observada com o uso das flores seja devido à presença destas substâncias, que também são derivados polifenólicos.

Dessa forma, conclui-se que a atividade anti-inflamatória das espécies foi significativamente diferente e que medidas devem ser tomadas para evitar que ocorram erros de rotulagem e identificação das espécies, para que não sejam confundidas. Uma maior e mais completa investigação deve ser realizada com a espécie *S. cordifolia*, para confirmar o seu efeito terapêutico e estabelecer os critérios de segurança e eficácia do seu uso.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, F.; LING, S. K.; MAN, S.; TAN, A. L.; TAN, H. P.; ABDULLAH, Z. Characterization and identification of *Labisia pumila* by multi-steps infrared Spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 200–206, 2012.
- ABDALLAH, H. M.; ALMOWALLAD, F. M.; ESMAT, A.; SHEHATA, I. A.; ABDEL-SATTAR, E. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Chrozophora tinctoria*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 74–80, 2015.
- AGGARWAL, B. B.; PRASAD, S.; REUTER, S.; KANNAPPAN, R.; YADEV, V. R.; PRAK, B.; KIM, J. H.; GUPTA, S. C.; PHROMNOI K.; SUNDARAM, C.; PRASAD, S. CHATURVEDI, M. M.; SUNG, S. Identification of Novel Anti-inflammatory Agents from Ayurvedic Medicine for Prevention of Chronic Diseases. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 11, p. 1595–1653, 2011.
- AHN, K. S.; NOH, E. J.; CHA, K. H.; KIM, Y. S.; LIM, S. S.; SHIN, K. H.; JUNG, S. H. Inhibitory effects of Iridogenin from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Life Sciences**, v. 78, p. 2336 – 2342, 2006.
- ALBERT, L. H. B.; VICTORIA-FILHO, R. Leaf Micromorphology of *Sida* spp. Species (prickly sida). **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p.337-342, 2002.
- ALESIANI, D.; PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CICCONI, R.; KAROU, D.; D'ARCANGELO G.; CANINI, A. Identification of phenolic compounds from medicinal and melliferous plants and their cytotoxic activity in cancer cells. **Caryologia**, v. 60, p. 90-95, 2007.
- ANYASOR, G. N.; ONAJOBI, F.; OSILESI, O. ADEBAWO, O.; OBOUTOR, E. M. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Costus afer* Ker Gawl. hexane leaf fraction in arthritic rat models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 543-551, 2014.
- ARAÚJO, A. S., da ROCHA, L. L., TOMAZELA, D. M., SAWAYA, A. C. H. F., ALMEIDA, R. R., CATHARINO, R. R., et al. (2005). Electrosprayionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **Analyst**, v. 130, p. 884–889, 2005.
- ARAUJO, P.; FROYLAND, L. Optimization of an extraction method for the determination of prostaglandin E₂ in plasma using experimental design and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 830, n. 2, p. 212-217, 2006.
- BALDI, D.; IZZOTTI, A.; BONICA, P.; PERA, P.; PULLIERO, A. Degenerative periodontal-diseases and oral osteonecrosis: The role of gene-environment interactions. **Mutation Research**, v. 667, n. 1-2, p. 118-131, 2009.
- BASSBASI, M.; DE LUCA, M.; IOELE, G.; OUSSAMA, A.; RAGNO, G. Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 210–215, 2014.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, 166-173, 2003.
- BEEBE, K.R.; PELL, R.J; SEASHOLTZ, M.B.; **Chemometrics: A Practical Guide**. John Wiley & Sons, New York, 1998.
- BENKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GÜRGAN, C.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y. T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 4, p. 347-51, 2007.

BIASOLI, F.; YERETZIAN, C.; MÄRL, T. D.; DEWULF, J.; LAGENHOVE, H. V. Direct-injection mass spectrometry adds the time dimension to (B)VOC analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1003-1017, 2011.

BLEWETT, J. A.; VARMA, D.; GILLES, T.; LIBONATI, J. R.; JANSEN, S. A. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 4, p. 653-666, mar. 2008.

BODET, C.; LA, V. D.; EPIFANO, F.; GRENIER, D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, p. 400–407, 2008.

BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. Classification of Brazilian vinegars according to their ^1H NMR spectra by pattern recognition analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1455-1460, 2009.

BOGATCHEVA, N. V.; SERGEEVA, M. G.; DUDEK, S. M.; VERIN, A. D. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. **Microvascular Research**, v. 69, n. 3, p. 107-127, maio 2005.

BOUKHRIS, M.; NASRI-AYACHI, M.; MEZGHANI, I.; BOUAZIZ, M.; BOUKHRIS, M. SAYADI, S. Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 604-610, 2013.

BOULESTEIX, A. L.; STRIMMER, K. Partial least squares: a versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data. **Briefings in Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 32-44, 2007.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira 4 ed.** ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10 de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 9 mar. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 2012.

BREITBACH, U. B.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P.; FARIA, J. E. Q. BRANDÃO, M. G. L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, 2013.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**, 1ª ed., Wiley, Nova Iorque, 2003.

BROWNBAB, G. P.; VENUTO, R. C. Thromboxane receptors in human kidney tissues. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 57, n. 4, p. 179-188, jun. 1999.

BUCCELLATI, C.; FUMAGALLI, F.; VIAPPIANI, S.; FOLCO, G. Leukotriene modifiers: novel therapeutic opportunities in asthma. **Il Farmaco**, v. 57, n. 3, p. 235-242, mar. 2002.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau - Safranin. **Mikrokosmos**, v.61, n.8, p. 225, 1972.

BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; MELLO, E. V. S. DE L.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; DE MELLO, J. C. P.; HENSEL, A. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical

investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, v. 99, p. 252-260, 2014.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in theantinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 2, p. 139-154, 2005.

CABRAL, E. C. **Utilização da técnica de *Fingerprinting* por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais**. 2010. 144p. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Ed. E-papers 1ª edição, Rio de Janeiro, 261 p., 2003.

CAO, H.; XIAO, L.; PARK, G.; WANG, X.; AZIM, A.; CHRISTMAN, J.; van BREEMEN, R. An improved LC–MS/MS method for the quantification of prostaglandins E₂ and D₂ production in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 372, n. 1, p. 41-51, jan. 2008.

CARRANZA, F. A. Jr. **Periodontia Clínica**. Sétima edição, Guanabara koogan, Rio de Janeiro, p. 250., 1992

CARRETERO, M. E.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; TILLET, S.; ISRAEL, A.; NOGUERA, B. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba*(Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 11-15, 2008.

CARVALHO, F. B.; GUTIERRES, J. M.; BOHNERT, C.; ZAGO, A. M.; ABDALLA, F. H.; VIEIRA, J. M.; PALMA, H. E. OLIVEIRA, S. M.; SPANEVELLO, R. M.; DUARTE, M. M.; LOPES, S. T. A.; AIELLO, G.; AMARAL, M. G.; PIPPI, N. L.; ANDRADE, C. M. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 378-390, 2015.

CASTRO, A.A.M.; PRADO, P.P.L. Algoritmos para reconhecimento de padrões, **Revista Ciências Exatas**, Taubaté, v.5-8, p. 129-145, 2002.

CATHARINO, R. R., CUNHA, I. B. S., FOGAÇA, A. O., FACCO, E. M. P., GODOY, H. T., DAUDT, C. E.Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization massspectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, p. 185–190, 2006.

CATHCART, M. C.; GATELY, K.; CUMMINS, R.; DRAKEFORD, C.; KAY, E. W.; O'BYRNE, K. J.; PIDGEON, G. P. Thromboxane synthase expression and correlation with VEGF and angiogenesis in non-small cell lung cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 747–755, 2014.

CAVAR, S.; MAKSIMOVI, M. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Herq. **Food Control**, v. 23, p. 263-267, 2012.

CHEN, Y.; ZHU, S. B.; XIE, M. Y.; NIE, S. P.; LIU, W.; LI, C.; GONG, X. G.; WANG, Y. X. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 623, n. 2, p. 146-156, 2008.

CHEN, X.; TANNER, K.; LEVINE, J. D. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E₂ in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 267, n. 2, p. 105-108, maio 1999.

CHEUNG, D. W. S.; KOON, C. M.; WAT, E.; KO, C. H.; CHAN, J. Y. W.; YEW, D. T. W.; LEUNG, P. C.; C, W. Y.; LAU, C. B. S.; FUNG, K. P. A herbal formula containing roots of *Salvia*

miltiorrhiza (Danshen) and Pueraria lobata (Gegen) inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through inhibition of nuclear factor κ B (NF κ B) pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 776–783, 2013.

CHOMYSZYN-GAJEWSKA, M.; CZAJKOWSKA, B.; BLAZEWICZ, M.; PAMULA, P.; PTAK, M. In vitro response of macrophages to a new carbon-poly lactide composite for the treatment of periodontal diseases. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 463–470, jan 2002.

CHOONG, Y. K.; XU, C. H.; LAN, J.; CHEN, X. D.; JAMAL, J. A. Identification of geographical origin of Lignosus samples using Fourier transform infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1069, p. 188–195, 2014.

CHU, C. C.; HSING, C. H.; SHIEH, J. P.; CHIEN, C. C.; HO, C. M.; WANG, J. J. The cellular mechanisms of the antiemetic action of dexamethasone and related glucocorticoids against vomiting. **European Journal of Pharmacology**, v. 722, n. 5 p. 48–54, 2014.

CHUN, M. H.; KIM, E. K.; YU, S. M.; OH, M. S.; MOON, K. Y.; JUNG, J. H.; HONG, J. GC/MS combined with chemometrics methods for quality control of Schizonepeta tenuifolia Briq: Determination of essential oils. **Microchemical Journal**, v.97, p. 274–281, 2011.

COLE, R.B. (Ed.). **Electrospray Ionization Mass Spectrometry**. Wiley, New York. 1997

COLVARD, M. D.; CORDEL, G. A.; VILLALOBOS, R.; SANCHO, G.; SOEJARTO, D. D.; PESTLE, W.; ECHEVERRI, T. L.; PERKOWITZ, K. M.; MICHEL, J. Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 134–142, ago 2006.

COMMISSO, M.; STRAZZER, P.; TOFFALI, K.; STOCCHERO, M.; GUZZO, F. Untargeted metabolomics: an emerging approach to determine the composition of herbal products. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5 p. 1–7, 2013.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A. *In vivo* anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 144–151, fev. 2008.

COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C.; MAY, G. M. O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Química Nova**, vol. 28, n.. 6, 1116–1122, 2005.

CROOKS, S. W.; STOCKLEY, R. A. Leukotriene B₄. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n. 2, p. 173–178, mar. 1998.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacology Research**, v. 52, n. 1, p. 72–82, jul. 2005.

De NATALE, A.; POLLIO, A. Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109 p. 295–303, 2007.

DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectrometria no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte 1. **Química Nova**, v. 35, n. 1, 223–229, 2012.

DE SOUZA, G. C.; HAAS, A. P.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135–143, 2004.

DETTMER, K.; ANOROV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 1 p. 51–78, 2007.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005

ERVE, T. van't.; LIH, F. B.; KADIISKA, M. B.; DETERDING, L. J.; ELING, T. E.; MASON, R. P. Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-PGF2 α / PGF2 α ratio distinguishes chemical from enzymatic lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 245-251, 2015.

ESTEVES, P. F.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; CAMPOS-BUZZI, F.; MEIRA, A. V.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive activity of *Malva sylvestris* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3 p. 454-456, 2009.

FERREIRA, M. C. M.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. V. 22, N. 5, 724-731, 1999.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C. V. F.; RODRIGUES, H. M. S. L.; MOURÃO, R. H. V.; ANDRADE, M. R.; ANTONIOLLI, A. R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 273–278, 2000.

GAN, F.; YE, R. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 100–105, 2006.

GAO, H. M.; LIU B.; WANGGIN, Z.; JAU-SHYONG, H. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 8, p. 395-401, ago. 2003.

GAO, W.; SCHMIDTKO, A.; WOBST, I.; LU, R.; ANGIONI, C.; GEISSLINGER, G. Prostaglandin D₂ produced by hematopoietic prostaglandin D synthase contributes to LPS-induced fever. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 145–150, 2009.

GARCIA, L. M. Z.; OLIVEIRA, T. F.; SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, E. S. Statistical mixture design — Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, p. 1–7, 2010.

GASPARETTO, J. C.; MARTINS, C. A. F.; HAYASHI, S. S.; OTUKY, M. F.; PONTAROLO, R. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 2, p.172-189, fev 2012.

GLOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381.

GOODACRE, R.; YORK, E. V.; HEALD, J. K.; SCOTT, I. M. Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 62, p. 859–863, 2003.

GREENE, E. R.; HUANG, S.; SERHAN, C. N.; PANIGRAHY, D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. **Prostaglandins & Others Lipid Mediators**, v. 96, n. 1-4, p. 27-36, nov. 2011.

GUARRERA, P. M. Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 1-25, jan. 2005.

HAGEL, J.; FACCHINI, P. J. Plant metabolomics: Analytical platforms and integration with functional genomics. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 479-497, 2008.

HAMILTON, J. G.; KAROL, R. J. High performance Liquid Chromatography (HPLC) of arachidonic acid metabolites. **Progress in Lipid Research**, v. 21, n. 3, p. 155-170, 1982.

HARA, S.; KAMEI, D.; SASAKI, Y.; TANEMOTO, A.; NAKATANI, Y.; MURAKAMI, M. Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 651-659, jun 2010.

HARRIS, G. S.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 144-150, mar. 2002.

HENRY, A.G.; PIPERNO, D. R. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqai, Syria. **Journal of Archaeological Science**, v. 35, p. 1943–1950, 2008.

HEO, S. J.; YOON, W. J.; KIM, K. N.; OH, C.; CHOI, Y. U.; YOON, K. T.; KANG, D. Y.; QIAN, Z. J.; CHOI, I. W.; JUNG, W. K. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3336–3342, p. 2012.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Method to Modern Techniques of Plant Analysis*, **Chapman and Hall**, London 1984.

HEREDIA, F.J.; FRANCIA-ARICHA, E.M.; RIVAS-GONZALO, J.C., et al. Chromatic chaterization of anthocyanins from redgrapes-I. PH effect, **Food Chemistry**, v.63, n.4, p. 491-498, 1998.

HISHINUMA, T. SUZUKI, K.; MASAYOSHI, S.; YAMAGUCHI, H; SUZUKI, N.; YOSHIHISA T.; KANEKO, I.; ONO, M.; GOTO, J. Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid chromatography/tandem mass spectrometry: The effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, n. 6, p. 321-329, jun. 2007.

HOLGATE, S. T.; BRADDING, P.; SAMPSON, A. P. Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: New directions in asthma therapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 98, n. 1, p. 1-13, jul. 1996.

HOUSSEN, M. E.; RAGAB, A.; MESBAH, A.; EL-SAMANOUDY, A. Z.; OTHMAN, G.; FATHY, A.; BADRIA, F. A. Natural anti-inflammatory products and leukotriene inhibitors as complementary therapy for bronchial asthma. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 10-11, p. 887-890, jul. 2010.

HUANG, W.Y.; WANG, J.; LIU, Y.M; ZHENG, Q.S.; LI, C.Y. Inhibitory effect Of Malvidin on TNF- α -induced inflammatory response in endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, p. 67-72, 2014.

ISHIZUTA, T.; KAWAKAMI, M.; HIDAKA, T. MATSUKI, Y.; TAKAMIZAWA, M.; SUZUKI, K. et al. Stimulation with thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 112, n. 3, p. 464–470, jun. 1998.

JAIN, A.; CHOUBEY, S.; SINGOUR, P. K.; RAJAK, H.; PAWAR, R. S. *Sida cordifolia* (Linn) – An overview. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 01, n. 02, p 23-31, 2011.

JEON, Y. J.; HAN, S. H.; LEE, Y. W.; LEE, M.; YANG, K. H.; KIM, H. M. Dexamethasone inhibits IL-1b gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kBrRel and AP-1 activation. **Immunopharmacology**, v. 48, p. 173–183, 2000.

KHURANA, N.; GAJBHIYE, A. Ameliorative effect of *Sida cordifolia* in rotenone induced oxidative stress model of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 39, p. 57-64, 2013.

KRUGER, M. J.; DAVIES, N.; MYBURGH, K. H.; LECOUR, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41-52, 2014.

KATUGAMPOLA, S. D.; DAVENPORT, A. P. Thromboxane receptor density is increased in human cardiovascular disease with evidence for inhibition at therapeutic concentrations by the AT1 receptor antagonist losartan. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 7, p. 1385–1392, dez. 2001.

KONATÉ, K.; BASSOLÉ, I. H. N.; HILOU, A.; AWORET-SAMSENY, R. R. R.; SOUZA, A.; BARRO, N.; DICKO, M. H.; DATTÉ, J. Y.; M'BATCHI, B. Toxicity assessment and analgesic activity investigation of aqueous acetone extracts of *Sida acuta* Burn f. and *Sida cordifolia* L. (Malvaceae), medicinal plants of Burkina Faso. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 120-131, 2012.

KUBAVAT, J. B.; ASDAQ, S. M. B. Role of *Sida cordifolia* L. leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 162–165, 2009.

LALLI, J. Y. Y.; VANN ZYL, R. L.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. In vitro biological activities of South African Pelargonium (Geraniaceae) species. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 153-157, 2008.

LEE, H. S.; RYU, D. S.; LEE, G. S.; LEE, D. S. Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: Suppression of NF- κ B activation and MAPK signaling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 271-276, 2012.

LEPORATTI, M. L.; CORRADI, L. Ethnopharmacobotanical remarks on the Province of Chieti town (Abruzzo, Central Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74 p. 17–40, 2001.

LI, B. Y.; HU, Y.; LIANG, Y. Z.; XIE, P. S.; DU, Y. P. Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, n. 1, p. 69-77, 2004.

LIN, I. C.; KUO, C. D. Pro-inflammatory effects of commercial alpha-lactalbumin on RAW 264.7 macrophages is due to endotoxin contamination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2642–2649, 2010.

LIN, W. S.; YANG, C. M.; KUO, B. J. Classifying cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) based on corrected canopy reflectance spectra data using the orthogonal projections to latent structures (O-PLS) method. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 115, p. 25-36, 2012.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia Clínica e implantologia Oral**. Guanabara Koogan, quinta edição, Rio de Janeiro, 2010.

LIU, S.; FU, Y.; NIAN, S. Buffering colour fluctuation of purple sweet potato anthocyanins to acidity variation by surfactants. **Food Chemistry**, v. 162, n. 1, p. 16-21, 2014.

LOI, M. C.; POLI, F.; SACCHETTI, G.; SELENU, M. B.; BALLERO, M. Ethnopharmacology of Ogliastro (Villagrande Strisaili, Sardinia, Italy). **Fitoterapia**, v. 75, p. 277– 295, 2004.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, R. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 57– 60, 2012

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Anthocyanins: a brief review of structural characteristics and stability. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.3, p. 291-297, 2007.

LUO, M.; FLAMAND, N.; BROCK, T. G. Metabolism of arachidonic acid to eicosanoids within the nucleus. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 5-6, p. 618-625, maio/jun. 2006.

MALTA, J. B. N. S.; FELBERG, S.; MURÇA, M. A. S.; BARROS, M. A. C.; MIMICA, L. M. G. Risco de contaminação do corante azul de tripano após primeira utilização. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 1, p. 27-31, 2006.

MARCHEI, E.; PELLEGRINI, M.; PACIFI, R.; ZUCCARO, P.; PICHINI, S. A rapid and simple procedure for the determination of ephedrine alkaloids in dietary supplements by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1633-1641, 2006.

MAREE, J. E.; VILJOEN, A. M. Fourier transform near- and mid-infrared spectroscopy can distinguish between the commercially important *Pelargonium sidoides* and its close taxonomic ally *P. reniforme*. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 146–152, 2011.

MASOODI, M.; NICOLAOU, A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 20, p. 3023-3029, 2006.

MARINI, F.; BUCCI, R.; GINEVRO, I.; MAGRÌ, A. L. Coupling of IR measurements and multivariate calibration techniques for the determination of enantiomeric excess in pharmaceutical preparations. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 97, n. 1, p. 52-63, 2009.

MARINI, F. **Chemometrics in Food Chemistry**, 1ª ed., Elsevier, Amsterdã, Holanda, 2013.

MARTINS, L. R. R. **Perfil cromatográfico e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra)**. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2008. Tese de doutorado, 154 p.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: pca e pca de imagens. **Revista Analytica**, v. 06, n. 08, p.38-50, 2003.

MCDUGALL, G.; MARTINUSSEN, I.; STEWART, D. Towards fruitful metabolomics: High throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 362–369, 2008.

MEDEIROS, I. A.; SANTOS, M. R. V.; NASCIMENTO, N. M. S.; DUARTE, J. S. Cardiovascular effects of *Sida cordifolia* leaves extract in rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 19– 27, 2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 127-130, 2001.

MILLER, D. M. The taxonomy of *Pelargonium* species and cultivars, their origins and growth in the wild. In: LIS-BALCHIN, M. **Geranium and Pelargonium**. London: Taylor and Francis, 2002. p. 49-79.

MILLER, S. B. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 1, p. 37–49, 2006.

MINAMINO, T.; ITO, Y.; OHKUBO, H.; HOSONO, K.; SUZUKI, T.; SATO, T.; AE, T.; SHIBUYA, A.; SAKAGAMI, H.; NARUMIYA, S.; KOIZUMI, W.; MAJIMA, M. Thromboxane A₂ receptor signaling promotes liver tissue repair after toxic injury through the enhancement of macrophage recruitment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 259, n. 1, p. 104–114, 2012.

MUBARAK, K. K. A review of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Medicine**, v. 104, n. 1, p. 9-21, jan. 2010.

MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; BERRY, K. Z.; HANKIN, J.; HARRISON, K.; JOHNSON, C.; KRANK, J.; McANROY, A.; UHLSON, C.; ZARINI, S. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. **Analytical Biochemistry**, v. 346, n. 1, p. 1-42, nov. 2005.

NAEINI, A. R.; NAZERI, M.; SHOKRI, H. Antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Pelargonium graveolens* and *Cuminum cyminum* essential oils towards three species of *Malassezia* isolated from patients with pityriasis versicolor. **Jornal de Mycologie Médicale**, v. 21, p. 87—91, 2011.

NAGAI, H. Prostaglandin as a Target Molecule for Pharmacotherapy of AllergicInflammatory Diseases. **Allergy International**. v. 57, p. 187-196, 2008.

NAHAR, P. P.; DRISCOLL, M. V.; LI, L.; SLITT, A. L.; SEERAM, N. P. Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 126-136, 2014.

NAKAHATA, N. Thromboxane A₂: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 18-35, abr. 2008.

NATH, D.; SETHI, N.; SINGH, R. K.; JAIN, A. K. Commonly used Indian abortifacient plants with special reference to their teratologic effects in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 147- 154, 1992.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Ed. Da Unicamp, 1ª Edição, 414 p. ano 2001.

NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados mutivariados, **Química Nova**, V. 21, N. 4, 467-469, 1998.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, V. 29, N. 6, 1401—1406, 2006

NIE, D.; LAMBERTI, M.; ZACHAREK, A.; LI, L.; SZEKERES, K.; TANG, K.; et al. Thromboxane A₂ regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 267, n. 1, p. 245–251, jan. 2000.

NITHIPATIKOM, K.; LAABS, N. D.; ISBELL, M. A.; CAMPBELL, W. B. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of cyclooxygenase metabolites of arachidonic acid in cultured cells. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 1, p. 135-145, fev. 2003.

NOVAIS, M. H.; SANTOS, I.; MENDES, S.; PINTO-GOMES, C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 183–195, 2004.

NUNES, X. P.; MAIA, G. L. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 642-644, Dez. 2006.

OLIVEIRA, S. G. D.; DE MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 428-437, 2012.

OMS-OLIU, G.; ODRIOZOLA-SERRANO, I.; BELLOSO, M. Metabolomics for Assessing Safety and Quality of Plant Derived Food. **Food Research International**, v 54, n. 1, p. 1172-1183, 2013.

PAIXÃO, J.; DINIS, T.C.P.; ALMEIDA, L.M. Malvidin-3-glucoside protects endothelial cells up-regulating endothelial NO synthase and inhibiting peroxynitrite-induced NF-κB activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 199, n. 3, p. 192-200, 2012.

PAN, R.; GUO, F.; LU, H.; FENG, W. W.; LIANG, Y. Z. Development of the chromatographic fingerprint of *Scutellaria barbata* D. Don by GC–MS combined with Chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 3, p. 391-396, 2011.

PASSALACQUA, N. G.; GUARRERA, P. M.; De FINE, G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). **Fitoterapia**, v. 78, n. 1, p. 52-68, jan. 2007.

PAWA, R. S.; JAIN, A.; SHARMA P.; CHAURASIYA, P. K.; SINGOUR, P. K.; *In Vitro* Studies on *Sida cordifolia* Linn for Anthelmintic and Antioxidant Properties. **Chinese Medicine**, v. 2, p. 47-52, 2011.

PEERBHAY, K.Y.; MUTANGA, O.; ISMAIL, R. Commercial tree species discrimination using airborne AISA Eagle hyperspectral imagery and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) in KwaZulu-Natal, South Africa, ISPRS. **Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 79, n. 19, 2013

PENROD, L. V.; ALLEN, R. E.; RHOADS, M. L.; LINESAND, S. W.; ARNS, M. J. Oxytocin stimulated release of PGF₂ α and its inhibition by a cyclooxygenase inhibitor and an oxytocin receptor antagonist from equine endometrial cultures. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1–4, p. 69-75, 2013.

PÉREZ-CHACÓN, G.; ASTUDILLO, A. M.; BALGOMA, D.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 12, p. 1103-1113, dez. 2009.

PETERSON, A.; MACHMUDAH, S.; ROY, B. C.; GOTO, M.; SASAKI, M.; HIROSE, T. Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 167–172, 2006.

PIERONI, A.; *et al.* Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 331-344, abr. 2004.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, nov. 2005.

PLAZONIC, A.; BUCAR, F.; MALES, Z.; MORNAR, A.; NIGOVIC, B.; KUJUNDZIC, N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpus* L.), using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, p. 2466–2490, 2009.

PRUDENTE, A. S.; LODDI, A. M. V.; DUARTE, M. R.; SANTOS, A. R. S.; POCHAPSKI, M. T.; PIZZOLATTI, M. G.; HAYASHI, S. S.; CAMPOS, F. R.; PONTAROLO, R.; SANTOS, F. A.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: *Malva sylvestris* L. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 324-331, 2013.

QUINTIERI, A. M.; BALDINO, N.; FILICE, E.; SETA, L. VITETTI, A.; TOTA, B.; DE CINDIO, B.; CERRA, M. C.; ANGELONE, T. Malvidin, a red wine polyphenol, modulates mammalian myocardial and coronary performance and protects the heart against ischemia/reperfusion injury. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1221-1231, 2013.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RANA, V. S.; JUYAL, J. P.; BLAZQUEZ, M. A. Chemical constituents of essential oil of *Pelargonium graveolens* leaves. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 12, n. 4, p. 216-218, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REZZI, S.; AXELSON, D. E.; HEBERGER, K.; RENIERO, F.; MARIANI, C. GUILLOU, C. Classification of olive oils using high throughput flow ¹H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 13-24, 2005.

RINALDO-MATTHIS, A.; HAEGGSTROM, J. Z. Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 676-681, jan 2010.

REDDANNA, P.; PRABHU, K. S.; WHELAN, J.; REDDY, C. C. Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 413, n. 2, p. 158-163, maio 2003.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1907-1914, 2007.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 711-717, 2008.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 583-588, 2011.

ROMITELLI, I.; MARTINS, M. B. G. Comparison of leaf morphology and anatomy among *Malva sylvestris* ("gerânio-aromático"), *Pelargonium graveolens* ("falsa-malva") and *Pelargonium odoratissimum* ("gerânio-de-cheiro"). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p.91-97, 2013.

ROSATO, A.; VITALI, C.; De LAURENTIS, N.; ARMENISE, D.; MILILO, M. A. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, v.14, p. 727-732, 2007.

SAMY, R. P.; PUSHPARAJ, P. N.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A compilation of bioactive compounds from Ayurveda. **Bioinformation**, v. 3, n. 3, p. 100-110, 2008.

SAWAYA, A. C. H. F., TOMAZELA, D. M., CUNHA, I. B. S., BANKOVA, V. S., MARCUCCI, M. C., CUSTODIO, A. R., et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.

SAXENA, G.; VERMA, P. C.; RAHMAN, L.; BANERJEE, S.; SHUKLA, R. S.; KUMAR, S. Selection of leaf blight-resistant *Pelargonium graveolens* plants regenerated from callus resistant to a culture filtrate of *Alternaria alternata*. **Crop Protection**, v. 27, p. 558-565, 2008.

SCHERRER, A. M.; MOTTI, R.; WECKERLE, C. S. 2005. Traditional plant use in teh areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 10, p. 129-143, fev. 2005.

SCHIOZER, A. L.; CABRAL, E. C.; GODOY, L. A. F.; CHAVES, F. C. M.; POPPI, R. J.; RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M. N.; BARATA, L. E. S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Extracts of the Leaves of *Arrabidaea chica*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 3, p. 409-414, 2012.

SCHIMLECK, L.R. et al. Eucalyptwood classification by NIR spectroscopy and principal componets analysis. **Appita Journal**, V. 49, N. 5, p. 319-324, 1996.

SCHMIDT, R.; COSTE, O.; GEISSLINGER, G. LC-MS/MS-analysis of prostaglandin E₂ and D₂ in microdialysis samples of rats. **Journal of Chromatography B**, v. 826, n. 1-2, p. 188-197, nov. 2005.

SCHMIDTKE, L.M.; SMITH, J. P.; MÜLLER, M. C.; HOLZAPFEL, B. P. Rapid monitoring of grapevine reserves using ATR-FT-IR and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, n. 30, p. 16-25, 2012.

SCHRÖDER, H.F. Polar organic pollutants from textile industries in the wastewater treatment process—biochemical and physico-chemical elimination and degradation monitoring by LC-MS, FIA-MS and MS-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, p. 349–362, 1996.

SHIRAZAKI, H.; KIKUCHI, M.; SEKI, N.; KANAIZUMI, E.; WATANABE, K.; HIMI, T. Expression and localization of the thromboxane A₂ receptor in human nasal mucosa. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, n. 6, p. 315-320, jun. 2007.

SIKORSKA, M. MATLAWSKA, I.; FRANSKI, R. 8-Hydroxyflavonoid glucuronides of *Malope trifida*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 26, p. 291-297, 2004.

SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIRR e calibração multivariada**. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Tese de doutorado, 98p.

SINGH, A. P. Bala (*Sida cordifolia*L.) - Is It Safe Herbal Drug? **Ethnobotanical Leaflets**, v. 10, p. 336-34, 2006.

SLEIMAN, N. H.; DAHER, C.F. 2009. *Malva sylvestris* water extract: A potencial anti inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. **57 th International Congress and Annual Meeting of the GA**. August 16-20. Geneva, Switzerland.

SOARES, D. X.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Mixture designs for exploring class diversity and metabolite fingerprinting: an efficient column chromatographic strategy. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, p. 288– 294, 2011.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3302–3310, 2007.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 644–652, 2009.

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy: **Fundamentals and Applications**, ed. Wiley, p. 244, 2004.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p.817-836, 2003.

SUN, K.; QU, X.; GAO, L.; MYATT, L. Dexamethasone Fails to Inhibit the Induction of Cytosolic Phospholipase A₂ Expression by Interleukin-1b in Cultured Primary Human Amnion Fibroblasts. **Placenta**, v. 27, p. 164-170, 2006.

SUTRADHAR, R. K.; SUTRADHAR, A.; RAHMAN A. K. M. M.; AHMAD, M. U.; BACHAR, S. C. Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. **Phytochemistry Letters**, n. 1, p. 179–182, 2008.

SZYMANSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, V. 8, S3–S16, 2012.

TAKEMIYA, T.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. **Neurochemistry International**, v. 51, n. 2-4, p. 112-120, jul/set. 2007.

TEROUZI, W.; LUCA, M.; BOLLI, A.; OUSSAMA, A.; PATUMI, M.; IOELE, G.; RAGNO, G. A discriminant method for classification of Moroccan olive varieties by using direct FT-IR analysis of the mesocarp section. **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, n. 2, p. 123-128, 2011.

TOMODA, M.; GONDA, R.; SHIMIZU, N.; YAMADA, H. Plant mucilages. XLII. Na Anti-complementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritiana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 37, n. 11, p. 3029-3032, nov. 1989.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p.469-479, 2007.

UARROTA, V. G.; MORESCO, R.; COELHO, B.; NUNES, E. C.; PERUCH, L. A. M.; NEUBERT, E. O.; ROCHA, M.; MARASCHIN, M. Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. **Food Chemistry**, v. 161, p. 67-78, 2014.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Série Botânica.**, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, jan./dez. 2006.

VITA RODRIGUEZ, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 1, p. 61-65, fev. 2010.

WANG, D.; DuBOIS, R. N. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 267, n. 2, p. 197-203, ago. 2008.

WILLEMSE, C. M.; STANDER, M. A.; VILLIERS, A. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography A**, v. 1319, p. 127– 140, 2013.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, 2001.

WOLFENDER, J. L.; RUDAZ, S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.

WORLEY, B.; HALOUSKA, S.; POWERS, R. Utilities for Quantifying Separation in PCA/PLS-DA Scores, **Analytical Biochemistry**, v. 433, n. 2, p. 102-104, 2013.

WU, Z.; TAO, L.; ZHANG, P.; LI, P.; ZHU, Q.; TIAN, Y.; DU, G.; LV, M.; YANG, T. Diffuse reflectance mid-infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) for rapid identification of dried sea cucumber products from different geographical áreas. **Vibrational Spectroscopy**, v. 53, p. 222–226, 2010.

WÜST, M.; REXROTH, A.; BECK, T.; MOSANDL, A. Mechanistic Aspects of the Biogenesis of Rose Oxide in *Pelargonium graveolens* L'Heritier. **Chirality**, v. 10, p. 229-237, 1998.

XIE, L.; YING, Y.; YING, T. Combination and comparison of chemometrics methods for identification of transgenic tomatoes using visible and near-infrared diffuse transmittance technique. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 395-401, 2007.

XU, B.; ZHANG, G.; SUN, S.; XU, C.; CHEN, J.; TU, Y.; ZHOU, Q.; CUI, M.; WANG, J.; WEN, C. Rapid discrimination of three kinds of *Radix Puerariae* and their extracts by Fourier transform

infrared spectroscopy and two-dimensional correlation infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1018, p. 88–95, 2012.

YANG, P.; FELIX, E.; MADDSSEN, T.; FISCHER, S. M.; NEWMAN, R. A. Quantitative high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 2- and 3-series prostaglandins in cultured tumor cells. **Analytical Biochemistry**, v. 308, n. 1, p. 168-177, set. 2002.

YI, L. Z.; YUAN, D. L.; LIANG, Y. Z.; XIE, P. S.; ZHAO, Y. Quality control and discrimination of *Pericarpium Citri Reticulatae* and *Pericarpium Citri Reticulatae Viride* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and multivariate statistical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 588, n. 2, p.153-320, 2007.

YOKOMIZO, T.; UOZUMI, N.; TAKAHASHI, T.; KUME, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene A₄ hydrolase and leukotriene B₄ metabolism, **Journal of Lipid Mediator and Cell Signalling**, v. 12, n. 2-3, p. 321-332, out. 1995.

YOUNES, R.; GHORRA, C.; KHALIFE, S.; INGONDJO-TCHEN-CHANGOTADE, S.; YOUSFI, M.; WILLIG, C.; SENNI, K.; GODEAU, G.; NAAMAN, N. Pertinent cell population to characterize periodontal disease. **Tissue and Cell**, v. 41, n. 2, p. 141-150, abr 2009.

ZHAO M.; LUO, Y.; LI, Y.; LIU, X.; WU, J.; LIAO, X.; CHEN, F. The identification of degradation products and degradation pathway of malvidin-3-glucoside and malvidin-3,5-diglucoside under microwave treatment. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3260-3267, 2013.

ZHANG, Y.; SHU, Z.; YIN, L.; MA, L.; WANG, X.; FU, X. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of non-alkaloids fractions from *Aconitum flavum* in vivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 47-52, 2015.

ZENG, Z. D.; LIANG, Y. Z.; CHAU, F. T.; CHEN, S.; DANIEL, M. K. W.; CHAN, C. o. Mass spectral profiling: an effective tool for quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, p. 89-98, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E OS GRUPOS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i>	213
ANEXO 2 – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E OS GRUPOS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM EXTRATO DE <i>S. cordifolia</i>	214
ANEXO 3 – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E OS GRUPOS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM EXTRATO DE <i>P. graveolens</i>	215
ANEXO 4 – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA NA CONCENTRAÇÃO DE PROSTANÓIDES ENTRE AMOSTRAS CONTROLE E AMOSTRAS QUE RECEBERAM TRATAMENTO	216
ANEXO 5 – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> EM ASSOCIAÇÃO COM LPS E AMOSTRAS TRATADAS COM LPS	217
ANEXO 6 – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATO DE <i>S. cordifolia</i> EM ASSOCIAÇÃO COM LPS E AMOSTRAS TRATADAS COM LPS	218
ANEXO 7 – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATO DE <i>P. graveolens</i> EM ASSOCIAÇÃO COM LPS E AMOSTRAS TRATADAS COM LPS	219

ANEXO I - VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E OS GRUPOS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM EXTRATO DE *M. sylvestris*

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	LPS (µg/mL)	ANOVA (valor p)	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (µg/mL)	TESTE t (valor de p)
<i>M. sylvestris</i>	Bruto	0,0	<0,001	1,0	0,401
				10,0	0,315
				50,0	0,112
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,650
				10,0	0,088
				50,0	0,203
				100,0	0,006
				1000,0	<0,001
	Hexano	0,0	<0,001	1,0	0,898
				10,0	0,065
				50,0	0,072
				100,0	0,011
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,374
				10,0	0,659
				50,0	0,345
				100,0	0,003
				1000,0	<0,001
	Clorofórmio	0,0	<0,001	1,0	0,375
				10,0	0,485
				50,0	0,142
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,504
				10,0	0,273
				50,0	0,377
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
	Acetato de etila	0,0	<0,001	1,0	0,402
				10,0	0,152
				50,0	0,207
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,079
				10,0	0,075
				50,0	0,142
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
	Remanescente	0,0	<0,001	1,0	0,748
				10,0	0,369
				50,0	0,290
				100,0	0,002
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,078
				10,0	0,114
				50,0	0,287
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
	Flores	0,0	<0,001	1,0	0,924
				10,0	0,515
				50,0	0,516
				100,0	0,043
				1000,0	0,018
		0,5	<0,001	1,0	0,295
				10,0	0,125
				50,0	0,560
				100,0	0,052
				1000,0	0,010

NOTA: Todos os valores de p do Teste t foram obtidos da comparação entre amostras que receberam tratamento (alguma concentração de extrato de planta) com amostras controle

ANEXO II – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E OS GRUPOS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM EXTRATO DE *S. cordifolia*

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	LPS (µg/mL)	ANOVA (valor p)	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (µg/mL)	Teste t (valor de p)
<i>S. cordifolia</i>	Bruto	0,0	<0,001	1,0	0,235
				10,0	0,055
				50,0	0,357
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,394
				10,0	0,119
				50,0	0,135
				100,0	0,001
				1000,0	<0,001
	Hexano	0,0	<0,001	1,0	0,173
				10,0	0,709
				50,0	0,140
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,374
				10,0	0,176
				50,0	0,567
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
	Clorofórmio	0,0	<0,001	1,0	0,076
				10,0	0,070
				50,0	0,665
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,108
				10,0	0,140
				50,0	0,150
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
	Acetato de etila	0,0	<0,001	1,0	0,475
				10,0	0,531
				50,0	0,407
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,153
				10,0	0,169
				50,0	0,183
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
	Remanescente	0,0	<0,001	1,0	0,076
				10,0	0,088
				50,0	0,091
				100,0	0,585
				1000,0	0,018
		0,5	<0,001	1,0	0,879
				10,0	0,303
				50,0	0,695
				100,0	0,012
				1000,0	0,023

NOTA: Todos os valores de p do Teste t foram obtidos da comparação entre amostras que receberam tratamento (alguma concentração de extrato de planta) com amostras controle

ANEXO III – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E OS GRUPOS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM EXTRATO DE *P. graveolens*

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	LPS (µg/mL)	ANOVA (valor p)	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (µg/mL)	Teste t (valor de p)
<i>P. graveolens</i>	Bruto	0,0	<0,001	1,0	0,163
				10,0	0,658
				50,0	0,211
				100,0	0,007
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,607
				10,0	0,831
				50,0	0,101
				100,0	<0,001
				1000,0	0,009
	Hexano	0,0	<0,001	1,0	0,910
				10,0	0,234
				50,0	0,106
				100,0	0,003
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,130
				10,0	0,067
				50,0	0,088
				100,0	0,009
				1000,0	<0,001
	Clorofórmio	0,0	<0,001	1,0	0,265
				10,0	0,931
				50,0	0,312
				100,0	0,246
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,925
				10,0	0,210
				50,0	0,755
				100,0	0,027
				1000,0	0,006
	Acetato de etila	0,0	<0,001	1,0	0,861
				10,0	0,150
				50,0	0,457
				100,0	0,011
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,809
				10,0	0,106
				50,0	0,332
				100,0	0,033
				1000,0	<0,001
	Remanescente	0,0	<0,001	1,0	0,943
				10,0	0,333
				50,0	0,828
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001
		0,5	<0,001	1,0	0,632
				10,0	0,234
				50,0	0,142
				100,0	<0,001
				1000,0	<0,001

NOTA: Todos os valores de p do Teste t foram obtidos da comparação entre amostras que receberam tratamento (alguma concentração de extrato de planta) com amostras controle

ANEXO IV – VALORES DE p DOS TESTES DE ANOVA E TESTE t PARA AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA NA CONCENTRAÇÃO DE PROSTANÓIDES ENTRE AMOSTRAS CONTROLE E AMOSTRAS QUE RECEBERAM TRATAMENTO

METABOLITO	TRATAMENTO	ANOVA (valor p)	TESTE t (valor de p)
PGE ₂	Dexametasona (10 µmol)	<0,001	<0,001 ^a
	LPS (0,5 µg/mL)		<0,001 ^b
PGD ₂	Dexametasona (10 µmol)	<0,001	<0,001 ^a
	LPS (0,5 µg/mL)		<0,001 ^b
TXB ₂	Dexametasona (10 µmol)	<0,001	<0,001 ^a
	LPS (0,5 µg/mL)		<0,001 ^b
PGF _{2α}	Dexametasona (10 µmol)	<0,001	<0,001 ^a
	LPS (0,5 µg/mL)		<0,001 ^b

NOTA: ^aamostras tratadas com dexametasona, quando comparadas com amostras controle; ^bamostras tratadas com LPS, quando comparadas com amostras controle

ANEXO V – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATO DE *M. sylvestris* EM ASSOCIAÇÃO COM LPS E AMOSTRAS TRATADAS COM LPS.

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	PROSTANÓIDE	CONCENTRAÇÃO DO TRATAMENTO (µg/mL)	ANOVA (valor p)	TESTE t (valor de p)
<i>M. sylvestris</i>	Bruto	PGE ₂	10	0,010	0,981 ^a
			50		0,043 ^b
		PGD ₂	10	0,001	0,356 ^a
			50		0,004 ^b
		TXB ₂	10	0,001	0,539 ^a
			50		0,009 ^b
	Hexano	PGF _{2α}	10	0,122	0,850 ^a
			50		0,085 ^b
		PGE ₂	10	0,144	0,131 ^a
			50		0,932 ^b
		PGD ₂	10	0,455	0,334 ^a
			50		0,394 ^b
	Clorofórmio	TXB ₂	10	0,008	0,259 ^a
			50		0,023 ^b
		PGF _{2α}	10	0,009	0,389 ^a
			50		0,014 ^b
		PGE ₂	10	0,023	0,429 ^a
			50		0,018 ^b
	Acetato de etila	PGD ₂	10	< 0,001	0,080 ^a
			50		< 0,001 ^b
		TXB ₂	10	< 0,001	< 0,001 ^a
			50		< 0,001 ^b
		PGF _{2α}	10	< 0,001	0,048 ^a
			50		< 0,001 ^b
	Remanescente	PGE ₂	10	0,033	0,292 ^a
			50		0,021 ^b
		PGD ₂	10	0,020	0,084 ^a
			50		0,024 ^b
		TXB ₂	10	0,075	0,741 ^a
			50		0,037 ^b
	Flores	PGF _{2α}	10	0,043	0,755 ^a
			50		0,038 ^b
		PGE ₂	10	0,060	0,266 ^a
			50		0,040 ^b
		PGD ₂	10	< 0,001	0,012 ^a
			50		< 0,001 ^b
		TXB ₂	10	0,765	0,764 ^a
			50		0,466 ^b
		PGF _{2α}	10	< 0,001	0,028 ^a
			50		< 0,001 ^b
		PGE ₂	10	< 0,001	0,052 ^a
			50		< 0,001 ^b
		PGD ₂	10	< 0,001	0,002 ^a
			50		0,008 ^b
		TXB ₂	10	0,273	0,336 ^a
			50		0,187 ^b
		PGF _{2α}	10	< 0,001	0,024 ^a
			50		< 0,001 ^b

NOTA: ^avalores de p do teste t quando é comparado o tratamento com 10 µg/mL de extrato e LPS com tratamento somente com LPS; ^bvalores de p do teste t quando é comparado o tratamento com 50 µg/mL de extrato e LPS com tratamento somente com LPS

ANEXO VI – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATO DE *S. cordifolia* EM ASSOCIAÇÃO COM LPS E AMOSTRAS TRATADAS COM LPS.

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	PROSTANÓIDE	CONCENTRAÇÃO DO TRATAMENTO (µg/mL)	ANOVA (valor p)	TESTE t (valor de p)
<i>S. cordifolia</i>	Bruto	PGE ₂	10	<0,001	0,003 ^a
			50		<0,001 ^b
		PGD ₂	10	<0,001	<0,001 ^a
			50		<0,001 ^b
		TXB ₂	10	0,034	0,084 ^a
			50		0,389 ^b
	Hexano	PGF _{2α}	10	0,001	0,051 ^a
			50		0,001 ^b
		PGE ₂	10	0,508	0,887 ^a
			50		0,364 ^b
		PGD ₂	10	0,550	0,699 ^a
			50		0,309 ^b
	Clorofórmio	TXB ₂	10	<0,001	0,350 ^a
			50		0,002 ^b
		PGF _{2α}	10	0,001	0,009 ^a
			50		0,002 ^b
		PGE ₂	10	0,621	0,813 ^a
			50		0,583 ^b
	Acetato de etila	PGD ₂	10	0,318	0,157 ^a
			50		0,480 ^b
		TXB ₂	10	0,039	0,452 ^a
			50		0,009 ^b
		PGF _{2α}	10	0,007	0,416 ^a
			50		0,013 ^b
	Remanescente	PGE ₂	10	<0,001	0,527 ^a
			50		0,003 ^b
		PGD ₂	10	<0,001	0,014 ^a
			50		<0,001 ^b
		TXB ₂	10	0,010	0,301 ^a
			50		0,008 ^b
		PGF _{2α}	10	<0,001	0,586 ^a
			50		<0,001 ^b
		PGE ₂	10	<0,001	0,010 ^a
			50		<0,001 ^b
		PGD ₂	10	<0,001	<0,001 ^a
			50		<0,001 ^b
		TXB ₂	10	<0,001	0,001 ^a
			50		<0,001 ^b
		PGF _{2α}	10	<0,001	0,007 ^a
			50		<0,001 ^b

NOTA: ^avalores de p do teste t quando é comparado o tratamento com 10 µg/mL de extrato e LPS com tratamento somente com LPS; ^bvalores de p do teste t quando é comparado o tratamento com 50 µg/mL de extrato e LPS com tratamento somente com LPS

ANEXO VII – VALORES DE p DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS TRATADAS COM EXTRATO DE *P. graveolens* EM ASSOCIAÇÃO COM LPS E AMOSTRAS TRATADAS COM LPS.

ESPÉCIE	FRAÇÃO DO EXTRATO	PROSTANÓIDE	CONCENTRAÇÃO DO TRATAMENTO (µg/mL)	ANOVA (valor p)	TESTE t (valor de p)
<i>P. graveolens</i>	Bruto	PGE ₂	10	0,007	0,224 ^a
			50		0,010 ^b
		PGD ₂	10	0,002	0,214 ^a
			50		0,003 ^b
		TXB ₂	10		0,042 ^a
			50	0,003	0,005 ^b
	Hexano	PGF _{2α}	10	0,029	0,093 ^a
			50		0,017 ^b
		PGE ₂	10	0,531	0,668 ^a
			50		0,604 ^b
		PGD ₂	10	0,003	0,008 ^a
			50		0,027 ^b
	Clorofórmio	TXB ₂	10	0,463	0,410 ^a
			50		0,230 ^b
		PGF _{2α}	10	0,824	0,591 ^a
			50		0,959 ^b
		PGE ₂	10	0,433	0,564 ^a
			50		0,313 ^b
	Acetato de etila	PGD ₂	10	0,229	0,185 ^a
			50		0,967 ^b
		TXB ₂	10	<0,001	0,122 ^a
			50		<0,001 ^b
		PGF _{2α}	10	0,185	0,579 ^a
			50		0,225 ^b
	Remanescente	PGE ₂	10	0,005	0,219 ^a
			50		0,008 ^b
		PGD ₂	10	0,008	0,221 ^a
			50		0,003 ^b
		TXB ₂	10	0,008	0,403 ^a
			50		0,009 ^b
		PGF _{2α}	10	0,028	0,776 ^a
			50		0,034 ^b
		PGE ₂	10	0,002	0,096 ^a
			50		0,007 ^b
		PGD ₂	10	<0,001	0,029 ^a
			50		<0,001 ^b
		TXB ₂	10	0,024	0,025 ^a
			50		0,072 ^b
		PGF _{2α}	10	0,005	0,069 ^a
			50		0,010 ^b

NOTA: ^avalores de p do teste t quando é comparado o tratamento com 10 µg/mL de extrato e LPS com tratamento somente com LPS; ^bvalores de p do teste t quando é comparado o tratamento com 50 µg/mL de extrato e LPS com tratamento somente com LPS